



Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

Mecanismos de entrada y de organización del complejo de replicación del virus de la fiebre aftosa: estudio comparativo con el virus de la enfermedad vesicular del cerdo y el virus de la estomatitis vesicular

TESIS DOCTORAL

Miguel Ángel Martín Acebes

Madrid, 2009

Memoria presentada por el Licenciado en Biología Miguel Ángel Martín Acebes para optar al grado de Doctor en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid.

Madrid, Abril de 2009

El trabajo presentado en esta Tesis Doctoral ha sido realizado en el Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, bajo la dirección de la Dra. Rosario Armas Portela y el Dr. Francisco Sobrino Castelló, y financiado por una beca predoctoral de Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Ciencia e Innovación.

A Charo

Agradecimientos

Nada de esto hubiera sido posible sin la ayuda y el apoyo de tantas personas...

Mis primeras palabras de agradecimiento están dedicadas a mis directores de Tesis: Rosario Armas Portela (Charo) y Francisco Sobrino (Pachi). Muchas gracias a los dos por brindarme la oportunidad de trabajar con vosotros, la confianza, el apoyo y el tiempo que me habéis dedicado. En especial, muchas gracias a ti, Charo, porque has sido mi Maestra, tanto en la Ciencia, como en incontables aspectos de la Vida.

Quiero expresar mi agradecimiento a todos los que han contribuido con materiales y reactivos indispensables para el desarrollo de este trabajo: Esteban Domingo, Cristina Escarmís, Ignacio V. Sandoval, Mauricio G. Mateu, Juan Carlos Sáiz, Esther Blanco, Victoria Ley, Miguel Ángel Jiménez-Clavero, Emiliana Brocchi, Kirsten Sandvig, J. Lindsay Whitton y Thomas Kirchhausen.

¿Y que habría sido de todo esto sin mis compañeros de laboratorio? Mónica (tantas cosas que hemos compartido), Ángela (mi pupila, y la que más me ha sufrido), Raúl (compañero de labo y de juergas), Maite (esa alegría y ese viaje a Ibiza), Yuri (aunque no hables mucho), Mari (la experiencia), Miguel (mi compañero de escritorio y el que me descubrió el SeqMan), Mónica (esa defensa de nuestras posesiones), Marga (tu ayuda... y no me olvido del anticuerpo que me financiaste) y Belén (un punto de vista de fuera del CBM). Muchas gracias también a Flavia, Brian, María, Marianne y Jakob, que estuvieron poco con nosotros pero dejaron su huella. Y no me puedo olvidar de Marina (ni de su risa). Menudos ratos hemos pasado: primero separados en Biológicas, entre el A107 y el C006, y ahora reunidos dentro del nuevo “edificio inteligente” en el 105. Y no me olvido de la mudanza...

Muchas gracias a todos mis compañeros del CBM, y en especial a todos los ex-209: Desi, Esther, Giorgos... y toda la buena gente que pasó por allí y tuve la suerte de conocer. Muchas gracias a toda la gente del 121 (antiguo CV-303), especialmente a Mercedes, Mónica y Celia. Gracias también a la gente del 205 (antiguo CV-118), en especial a Eva y a Verónica (por esos gradientes). Un recuerdo cariñoso para el resto de los Cultivadores: siempre permanecerá en mi memoria el antiguo CV-222 (que llegó a ser considerado mi segunda casa). Muchas gracias a todos, y sobre todo a Pepa, Carola y Cristina por los momentos míticos que hemos vivido allí dentro. Mención especial para M^a Ángeles, Nuncia y Alfonso, sin cuya labor y dedicación nada de esto habría sido posible.

Muchas gracias a los miembros del Servicio de Microscopía Electrónica del CBM, especialmente a Maite, y por supuesto, a todos los miembros del Servicio de Microscopía Óptica y Confocal del CBM. A todos ellos, muchas gracias, porque con su trabajo mirar qué había dentro de las células resultó fácil.

Muchas gracias a mis padres por haberme apoyado en todo momento y haber confiado en mí (y en mi aventura en la Ciencia). A mis amigos de Colme: Rubén, Pedro, Monroy, Iñaki, Rosa... Y por supuesto, muchas gracias a Ana por apoyarme y darme fuerzas... y todas esas cosas que ella sabe.

Abreviaturas

Ac	anticuerpo
AcM	anticuerpo monoclonal
AcP	anticuerpo policlonal
AF	Alexa Fluor
AN	apertura numérica
ANOVA	análisis de la varianza (<i>analysis of the variance</i>)
Arf	factor de ribosilación de ADP (<i>ADP-ribosylation factor</i>)
BEA	2-bromoetilamina hidrobromuro
BEI	etilenimina binaria (<i>binary ethylenimine</i>)
BFA	brefeldina A
BHK	línea celular derivada de riñón de hámster (<i>baby hamster kidney</i>)
BHKasc	línea celular derivada de BHK-21 que expresa un RNA antisentido frente a la clatrina
Bis	bisindolmaleimida I
BSA	seroalbúmina bovina (<i>bovine serum albumin</i>)
CAR	receptor de coxsackievirus y adenovirus (<i>coxsackievirus and adenovirus receptor</i>)
cDNA	DNA copia
α CD	α -ciclodextrina
CHO	línea celular derivada de ovario de hámster (<i>chinese hamster ovary</i>)
Cit D	citocalasina D
Con A	concanamicina A
COP	proteínas del recubrimiento de coatómero (<i>coatomer complex protein</i>)
cpm	cuentas por minuto
Cpmz	clorpromazina
C-terminal	carboxilo-terminal
CtBP1/BARS	<i>C-terminal-binding protein-1/brefeldin A-ADP ribosylated substrate</i>
CVB	coxsackievirus B
Da	dalton
DAF	<i>deccay accelerating factor</i>
DAPI	4'-6 diamidina-2-fenilindol (<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>)
DC-SIGN	<i>dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin</i>

DEAE	dietilaminoetil
DEPC	dietilpirocarbonato
DMEM	medio Eagle modificado por Dulbecco (<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>)
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico (<i>desoxiribonucleic acid</i>)
DTT	ditiotreitól
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ácido etilén diamino tetraacético
EEA1	antígeno 1 de endosomas tempranos (<i>early endosome antigen 1</i>)
EGTA	ácido etilén glicol tetraacético
EVB	enterovirus bovino (<i>bovine enterovirus, BEV</i>)
FA	fiebre aftosa (<i>foot-and-mouth disease, FMD</i>)
F-actina	actina filamentosa (<i>filamentous actin</i>)
g	valor de aceleración de la gravedad
GEF	factor de intercambio de nucleótidos de guanósina (<i>guanine nucleotide-exchange factor</i>)
GRP78	proteína regulada por glucosa 78 (<i>glucose-regulated protein 78</i>)
GPI	glicosil fosfatidil inositol (<i>glycosylphosphatidylinositol</i>)
GTP	guanósina trifosfato
HEPES	ácido (4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico
HS	heparán sulfato
Hsc70	<i>heat shock cognate protein 70</i>
IBRS-2	línea celular derivada de riñón de cerdo (<i>Instituto Biologico Renale Swine-2</i>)
ICAM-1	molécula de adhesión intercelular 1 (<i>intercellular adhesion molecule 1</i>)
Ig	inmunoglobulina
IRES	sitio de entrada interna del ribosoma (<i>internal ribosome entry site</i>)
JAM-A	<i>junctional adhesion molecule A</i>
kb	kilobase
LB	medio de cultivo Luria-Bertani
LDLR	receptor de lipoproteínas de baja densidad (<i>low density lipoprotein receptor</i>)
L-SIGN	<i>liver/lymph node-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin</i>
MCAT-1	<i>murine cationic amino acid transporter 1</i>
m.d.i.	multiplicidad de infección

min	minuto
MHC-I	complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (<i>major histocompatibility complex I</i>)
MWCO	<i>molecular weight cut off</i>
NA	naranja de acridina
N-terminal	amino-terminal
OV	ortovanadato de sodio
PABP	proteína de unión a poliA (<i>poliA binding protein</i>)
PAK-1	quinasa 1 activada por p21 (<i>p21-activated kinase 1</i>)
PBS	solución salina tamponada con fosfato (<i>phosphate buffer saline</i>)
PDI	proteín-disulfuro-isomerasa
PCR	reacción en cadena de la polimerasa (<i>polymerase chain reaction</i>)
p.i.	postinfección
PI3K	fosfatidilinositol 3-quinasa (<i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>)
PKC	proteína quinasa C (<i>protein kinase C</i>)
poliC	polirribocitidilato
poliA	poliadenilato
PP2	pirazolopirimidina-2
Rab	<i>Ras-related proteins in brain</i>
RNA	ácido ribonucleico (<i>ribonucleic acid</i>)
r.p.m.	revoluciones por minuto
RT	transcripción inversa (<i>retrotranscription</i>)
s	segundo
S	svedberg
SDS	dodecilsulfato sódico (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SFB	suero fetal bovino
SR-BI	<i>scavenger receptor class B type I</i>
Src	Sarcoma de Rous
t.a.	temperatura ambiente
TAE	tampón tris-acetato sódico-EDTA
Tet	tetraciclina
TF	transferrina
TNE	tampón tris-NaCl-EDTA
Tris	tris-hidroximetil-aminometano

U	unidades
UA	unidades arbitrarias
UFP	unidad formadora de placa
UTR	región no codificante (<i>untranslated region</i>)
UV	ultravioleta
V-ATPasa	ATPasa vacuolar
VEV	virus de la estomatitis vesicular (<i>vesicular stomatitis virus, VSV</i>)
VEVC	virus de la enfermedad vesicular del cerdo (<i>swine vesicular disease virus, SVDV</i>)
VFA	virus de la fiebre aftosa (<i>foot-and-mouth disease virus, FMDV</i>)

Códigos de una y tres letras para los aminoácidos

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

Índice

1. Resumen en inglés (Summary)	1
2. Introducción	5
2.1 Etapas iniciales en la infección viral	5
2.2 Rutas de internalización explotadas por los virus	5
2.2.1 Endocitosis mediada por vesículas revestidas de clatrina	9
2.2.2 Endocitosis mediada por <i>lipid-rafts</i> /caveolas	12
2.2.2.1 Caveolas	13
2.2.2.2 Endocitosis mediada por <i>lipid-rafts</i> (no caveolas)	14
2.2.3 Macropinocitosis	15
2.2.4 Rutas alternativas	15
2.3 Mecanismos de liberación del genoma utilizados por virus	16
2.4 La fiebre aftosa y otras enfermedades vesiculares importantes en Sanidad Animal .	16
2.4.1 La fiebre aftosa	16
2.4.1.1 El virus de la fiebre aftosa	17
2.4.1.2 Organización genómica del virus de la fiebre aftosa	17
2.4.1.3 Regiones no codificantes	18
2.4.1.4 Región codificante	19
2.4.1.4.1 Proteínas estructurales: estructura y propiedades de la cápsida; reconocimiento del receptor celular	19
2.4.1.4.2 Proteínas no estructurales	22
2.4.1.5 Interacción con la célula hospedadora	23
2.4.1.6 Variabilidad y dinámica de cuasiespecie	25
2.4.1.7 Respuesta inmune y vacunas frente al VFA	25
2.4.2 La enfermedad vesicular del cerdo	26
2.4.2.1 El virus de la enfermedad vesicular del cerdo	26
2.4.2.2 Organización genómica de VEVC	26
2.4.2.3 Proteínas estructurales: estructura, propiedades de la cápsida y reconocimiento del receptor celular	26
2.4.2.4 Interacción con la célula hospedadora	28
2.4.3 La estomatitis vesicular	29
2.4.3.1 El virus de la estomatitis vesicular	29

2.4.3.2 Interacción con la célula hospedadora.....	30
3. Objetivos	33
4. Materiales y métodos	37
4.1 Cultivo de células eucarióticas	37
4.2 Virus.....	38
4.3 Plásmidos (clones infecciosos)	38
4.4 Infecciones virales.....	39
4.4.1 Infección en medio líquido.....	39
4.4.2 Infección en medio semisólido.....	39
4.4.2.1 Titulación de virus total y de virus extracelular	39
4.4.2.2 Clonaje biológico.....	40
4.5 Tratamientos farmacológicos	40
4.6 Evaluación del efecto de los fármacos sobre los procesos endocíticos.....	41
4.6.1 Internalización de transferrina.....	41
4.6.2 Tinción con filipina	42
4.6.3 Tinción vital con naranja de acridina	42
4.7 Inmunodetecciones	42
4.7.1 Anticuerpos.....	42
4.7.2 Inmunofluorescencia indirecta	42
4.7.3 Transferencia e inmunodetección de proteínas: <i>western blot</i>	44
4.8 Microscopía óptica.....	44
4.8.1 Microscopía de fluorescencia convencional.....	44
4.8.2 Microscopía de fluorescencia confocal	44
4.9 Microscopía electrónica	45
4.9.1 Microscopía electrónica en células infectadas	46
4.9.2 Tinción negativa de viriones purificados	46
4.10 Aislamiento de mutantes resistentes a NH₄Cl.....	46
4.11 Aislamiento de mutantes con resistencia a pH ácido incrementada.....	47
4.12 Determinación de la sensibilidad diferencial a pH ácido.....	47
4.13 Amplificación y secuenciación de ácidos nucleicos.....	47
4.13.1 Extracción de RNA vírico	47

4.13.2 Obtención de cDNA y su amplificación por RT-PCR.....	47
4.13.3 Purificación y cuantificación de productos de PCR	48
4.13.4 Secuenciación de DNA	48
4.14 Clonaje molecular	49
4.15 Transcripción <i>in vitro</i> de plásmidos	51
4.16 Transfección de células eucarióticas con RNA viral.....	51
4.17 Inactivación de virus.....	51
4.18 Marcaje y purificación de viriones.....	52
4.19 Bloqueo con péptidos sintéticos de la adsorción del VFA	52
4.20 Neutralización con anticuerpos monoclonales	53
4.21 Métodos estadísticos y análisis de los datos	53
4.22 Disoluciones y tampones.....	53
5. Resultados	57
5.1 Caracterización de la ruta de entrada del VFA en cultivos celulares.....	57
5.1.1 El tratamiento con medio hipertónico inhibe la infección de VFA	57
5.1.2 La expresión de la cadena pesada de la clatrina es necesaria para la infección de VFA y de VEV	58
5.1.3 El progreso de la infección de VFA depende de la acidificación endosomal.....	59
5.2 Aislamiento y caracterización de mutantes de VFA resistentes a NH₄Cl.....	62
5.2.1 Aislamiento de mutantes de VFA resistentes a NH ₄ Cl.....	62
5.2.2 Los mutantes de VFA resistentes a NH ₄ Cl utilizan integrinas como receptor	64
5.2.3 Análisis de las mutaciones en la cápsida seleccionadas en los virus resistentes a NH ₄ Cl	64
5.2.4 Localización espacial de las mutaciones seleccionadas en presencia de NH ₄ Cl en la cápsida viral.....	65
5.2.5 La resistencia a NH ₄ Cl está relacionada con el incremento de la sensibilidad a pH ácido de las partículas en los mutantes del VFA.....	67
5.2.6 Confirmación de la resistencia a NH ₄ Cl del mutante c2.....	68
5.2.7 El mutante c2 es resistente al tratamiento con Con A	69
5.2.8 Disección del papel funcional de los cambios de aminoácido encontrados en la cápsida del mutante c2	70
5.2.9 El cambio VP3 A118V es suficiente para conferir resistencia a NH ₄ Cl y Con A	73

5.2.10 Estabilidad de los viriones de mutantes con el cambio VP3 A118V durante su purificación en gradientes de sacarosa.....	73
5.3 Aislamiento y caracterización de mutantes de VFA resistentes a pH ácido	75
5.3.1 Aislamiento de mutantes de VFA con resistencia incrementada a pH 6.....	75
5.3.2 La infección con mutantes con resistencia incrementada a pH 6 muestra una mayor sensibilidad frente a la inhibición de la acidificación endosomal.....	76
5.3.3 Análisis de las mutaciones en la cápsida seleccionadas en los virus con resistencia incrementada a pH 6	77
5.3.4 Localización espacial de las mutaciones seleccionadas en la cápsida de virus con resistencia incrementada a pH 6	78
5.3.5 El cambio VP1 N17D es responsable del incremento en la resistencia a pH 6...	79
5.4 Análisis de la internalización de VFA inactivado químicamente.....	81
5.4.1 Análisis de los viriones de VFA inactivados con BEI	81
5.4.2 El VFA inactivado es internalizado en células susceptibles	82
5.4.3 La internalización de VFA inactivado es dependiente de integrinas	83
5.4.4 El tratamiento con medio hipertónico inhibe la internalización del VFA inactivado en células susceptibles	85
5.5 Ruta de internalización de VEVC: estudio comparativo con VFA y VEV	87
5.5.1 La infección de VEVC es inhibida por tratamientos que afectan la endocitosis mediada por clatrina	87
5.5.2 Requerimientos de pH ácido en la infección de VEVC	88
5.5.3 Diferentes requerimientos de componentes del citoesqueleto en la infección con VEV, VEVC y VFA	91
5.5.4 Diferentes requerimientos de transducción de señales en la infección de VEV, VEVC y VFA	92
5.5.5 Diferentes requerimientos de colesterol para la infección con VEV, VEVC y VFA	94
5.6 Complejo de replicación de VEVC: estudio comparativo con VFA y VEV	96
5.6.1 Caracterización del complejo de replicación de VEVC.....	96
5.6.2 Efectos de la infección sobre el retículo endoplasmático y el complejo de Golgi	99
5.6.3 Microscopía electrónica en células infectadas con VEVC.....	99
5.6.4 Sensibilidad diferencial a brefeldina A de la infección con VEV, VEVC y VFA.....	102

6. Discusión	107
6.1 Etapas tempranas en la infección de VFA	107
6.1.1 Interacción con el receptor.....	107
6.1.2 Internalización de la partícula viral: papel funcional de la clatrina.....	107
6.1.3 Internalización de la partícula viral: papel funcional del colesterol.....	108
6.1.4 Papel de la acidificación endosomal.....	109
6.2 Mutantes de VFA con diferentes grados de sensibilidad a pH ácido	109
6.2.1 Los mutantes con mayor sensibilidad a pH ácido escapan a la inhibición por NH ₄ Cl.....	110
6.2.2. Los mutantes con resistencia incrementada a pH ácido son más sensibles al tratamiento con NH ₄ Cl.....	112
6.3 Internalización de VFA inactivado con BEI	114
6.4 Diferencias y similitudes en el mecanismo de entrada de VFA, VEVC y VEV	115
6.5 Complejo de replicación de VEVC: requerimiento diferencial de factores celulares con respecto a VFA y VEV	118
7. Conclusiones	123
8. Bibliografía	127
9. Anexo	153

Resumen en inglés (Summary)

1. Resumen en inglés (Summary)

Foot-and-mouth disease virus (FMDV) is a positive strand RNA virus included in the *Picornaviridae* family (*Aphthovirus* genus). FMDV genome is enclosed inside an icosahedral capsid built up with 60 copies of each of the four structural proteins (VP1 to VP4). Of special interest is an exposed loop of VP1 (termed G-H loop) which contains an Arg-Gly-Asp (RGD) triplet. These residues are involved in the interaction of the viral particle with integrins that act as its cellular receptor.

We characterized the endocytic route used by the type C FMDV isolate C-S8c1 to enter cultured cells (BHK-21 and IBRS-2). After binding to integrin, C-S8c1 was internalized by clathrin-dependent endocytosis as revealed by its sensitivity to hypertonic medium and expression of an antisense RNA targeted against clathrin heavy chain. FMDV particles were sorted to acidic endosomes for uncoating as revealed by inhibition of productive infection using drugs that raise endosomal pH (NH_4Cl and concanamycin A). Three C-S8c1 biological clones that exhibited various degrees of resistance to NH_4Cl were selected. A direct correlation was observed between the level of NH_4Cl resistance and an enhanced sensitivity of the mutant particles to acidic pH, indicating that mutants escaped from NH_4Cl effects by uncoating at more alkaline pH (less acidic). A single amino acid substitution VP3 A118V, was responsible of the phenotype exhibited by in the mutant that exhibited higher resistance to NH_4Cl . On the other hand, the amino acid substitution VP1 N17D, found common in six C-S8c1 mutants with enhanced resistance to acid pH, conferred enhanced acid resistance of virus particles as well as increased sensitivity to NH_4Cl . These results show that FMDV acid sensitivity can be modulated by point mutations and is directly related to the viral uncoating within endosomes.

The route of entry of C-S8c1 particles inactivated with binary ethylenimine (BEI) was also studied. Internalization of these particles was dependent on integrins and could be inhibited by treatment with hypertonic medium suggesting that, as described for infectious particles; they are internalized using the clathrin route. This observation may have implications in the distribution and antigenic presentation of FMDV inactivated vaccines.

FMDV entry route was compared to that of swine vesicular disease virus (SVDV) - a picornavirus (*Enterovirus* genus) -, and vesicular stomatitis virus (VSV) - an enveloped negative strand RNA virus included in the *Rhabdoviridae* family and a model virus for clathrin-mediated endocytosis studies -. Both viruses are responsible for important vesicular diseases, clinically indistinguishable from FMD. SVDV and VSV internalization was inhibited by treatments that impaired clathrin-mediated endocytosis and required traffic through an endosomal compartment. However, differences in the sensitivity to drugs that disrupt microtubules, cholesterol extraction from plasma membranes and inhibition of cell signaling machinery were found among the three viruses, indicating that different clathrin-mediated routes are responsible for the internalization of these viruses into different populations of early endosomes.

The structure of SVDV replication complex was also characterized by means of confocal and electron microscopy. To allow a direct comparison with the results obtained with FMDV and VSV, IBRS-2 cells, which are susceptible to the three viruses, were used for the infections. The general features of SVDV replication complex were similar to those of FMDV. In contrast to FMDV, SVDV and VSV infection was inhibited by Golgi complex disrupting agent brefeldin A. Taken together, these results show that differential cellular requirements are involved in the entry and replication of these three viruses, which share target tissues and clinical signs in natural hosts.

Introducción

2. Introducción

2.1 Etapas iniciales en la infección viral

El contacto inicial de la partícula viral se produce con moléculas de superficie de la célula susceptible de ser infectada (adsorción), por lo que la ausencia de receptores de superficie específicos para un virus constituye la primera barrera para una infección. Los virus utilizan como receptores moléculas de diversa naturaleza, como moléculas de adhesión celular, azúcares y componentes de la matriz extracelular (Tabla I). Un receptor puede ser utilizado por diferentes virus, al igual que un determinado virus puede utilizar diferentes receptores. Una vez unido el virus al receptor, el complejo formado puede deslizarse (*surfing*) por la membrana plasmática (Lehmann et al., 2005). Se han descrito diferentes movimientos dependiendo de la velocidad y distancia recorrida (Ewers et al., 2005; Schelhaas et al., 2008). En algunos casos se ha observado el agrupamiento (*clustering*) de varios receptores en microdominios de la membrana plasmática tras ser activados por la unión de partículas virales (Coyne y Bergelson, 2006). A continuación, el material genético viral debe ser introducido dentro de la célula hospedadora (penetración). Existen variantes de este mecanismo: mientras que algunos virus inyectan su material genético a través de la membrana celular -estrategia utilizada sobre todo por los virus que infectan bacterias (Rossmann et al., 2004)-, aquellos virus dotados de envoltura lipídica pueden fusionar con la membrana plasmática de la célula (Sieczkarski y Whittaker, 2005; Weissenhorn et al., 2007). En otros casos, como si de un diminuto caballo se Troya se tratase, la partícula viral completa es internalizada dentro de la célula aprovechando la maquinaria celular (Marsh y Helenius, 2006; Smith y Helenius, 2004).

2.2 Rutas de internalización explotadas por los virus

Existe una gran diversidad de rutas que una célula utiliza en condiciones normales para internalizar sustancias (Benmerah y Lamaze, 2007; Conner y Schmid, 2003; Mayor y Pagano, 2007; Sandvig y van Deurs, 2005). Como parásitos intracelulares obligados, los virus se sirven de ellas para entrar dentro de las células. Las moléculas de la superficie de la partícula viral encargadas de interactuar con el receptor mimetizan la estructura de ligandos celulares que, al unirse al receptor, pueden desencadenar una compleja cascada de fenómenos de transducción de señales (principalmente basados en fosforilaciones y defosforilaciones) que induce el ensamblaje de la maquinaria endocítica celular y la internalización de la partícula viral unida a su receptor (Coyne et al., 2007a; Liberali et al., 2008b; Pelkmans et al., 2005). De hecho, se han

Introducción

identificado más de 200 quinasas implicadas en los fenómenos de endocitosis (Pelkmans et al., 2005).

Tabla I. Ejemplos de receptores y mecanismos de internalización utilizados por virus

Virus ^a	Receptor	Ruta de entrada ^b	Referencia
Poxviridae			
Vaccinia	Glicosaminoglicanos	Macropinocitosis No clatrina, no caveola	(Mercer y Helenius, 2008) (Huang et al., 2008)
Asfaviridae			
Virus de la peste porcina africana		Clatrina	(Alcami et al., 1989)
Herpesviridae			
Herpesvirus humano 8	Integrina $\alpha_3\beta_1$	Clatrina	(Akula et al., 2003)
Virus de la varicela	Receptor de manosa-6-fosfato	Clatrina y <i>lipid-raft</i>	(Hambleton et al., 2007)
Adenoviridae			
Adenovirus 2	CAR, integrinas α_v	Clatrina y macropinocitosis	(Meier et al., 2002)
Adenovirus 3	CD46, integrinas α_v	Macropinocitosis	(Amstutz et al., 2008)
Adenovirus 5	CAR, integrinas α_v	Clatrina	(Chardonnet y Dales, 1970; Gastaldelli et al., 2008)
Polyomaviridae			
Poliomavirus de ratón	Gangliósidos con ácido siálico	No clatrina no caveola ^c macropinocitosis	(Gilbert y Benjamin, 2000; Liebl et al., 2006)
Virus BK	Gangliósidos	Caveola	(Eash et al., 2004)
Virus de simio 40	MHC-1 Gangliósidos	Caveola No clatrina, no caveola, <i>lipid-raft</i> ^d	(Anderson et al., 1996; Campanero-Rhodes et al., 2007; Pelkmans et al., 2001) (Damm et al., 2005)
Virus JC	Ácido siálico	Clatrina	(Pho et al., 2000)
Papillomaviridae			
Papilomavirus bovino 1	HS, integrinas α_6 , laminina 5	Clatrina Clatrina	(Day et al., 2003) (Laniosz et al., 2008)
Papilomavirus humano 16	HS, integrinas α_6 , laminina 5	Clatrina No clatrina, no caveola ^c	(Day et al., 2003) (Spoden et al., 2008)
Papilomavirus humano 31	No HS, integrinas α_6 , laminina 5	Caveola	(Smith et al., 2007; Smith et al., 2008)
Parvoviridae			
Parvovirus canino	Receptor de transferrina	Clatrina	(Hueffer et al., 2004; Parker y Parrish, 2000)
Retroviridae			
Virus de la inmunodeficiencia humana	No CD4 CD4	No clatrina, no caveola ^c Macropinocitosis y <i>lipid-raft</i> Clatrina	(Vidricaire y Tremblay, 2007) (Liu et al., 2002) (Bosch et al., 2008; Daecke et al., 2005)
Virus de la leucemia Moloney de ratón	MCAT-1	No clatrina ^a	(Lee et al., 1999)
Virus del tumor mamario de ratón	Receptor de transferrina	Clatrina	(Ross et al., 2002)
Reoviridae			
Reovirus tipo 1	JAM-A, integrina β_1	Clatrina	(Maginnis et al., 2008)
Rotavirus humano	Integrinas $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, hsc70 y ácido siálico	No clatrina, no caveola	(Sánchez-San Martín et al., 2004)
Rhabdoviridae			
Virus de la estomatitis vesicular	Fosfatidiliserina	Clatrina	(Johannsdottir et al., 2009; Matlin et al., 1982; Simpson et al., 1969; Sun et al., 2005)
Orthomyxoviridae			
Virus de la gripe	Ácido siálico	Clatrina No clatrina no caveola	(Chen y Zhuang, 2008; Matlin et al., 1981) (Sieczkarski y Whittaker, 2002b)
Bunyaviridae			
Virus Hantaan	Integrinas β_3	Clatrina	(Jin et al., 2002)
Virus Oropouche		Clatrina	(Santos et al., 2008)

(Tabla I. Continuación)

Virus ^a	Receptor	Ruta de entrada ^b	Referencia
<i>Arenaviridae</i>			
Virus de la coriomeningitis linfocítica	α -dextróglicano	No clatrina, no caveola ^c	(Borrow y Oldstone, 1994; Quirin et al., 2008; Rojek et al., 2008a)
		Clatrina	(Quirin et al., 2008)
Virus de la fiebre de Lassa	α -dextróglicano	Clatrina	(Vela et al., 2007)
		No clatrina, no caveola ^c	(Rojek et al., 2008b)
Virus Junin	Receptor de TF	Clatrina	(Martínez et al., 2007)
Virus Pichindé		Clatrina	(Vela et al., 2008; Vela et al., 2007)
<i>Picornaviridae</i>			
Coxsackievirus A9	Integrina $\alpha_3\beta_3$ y GRP87	<i>Lipid-raft</i>	(Triantafilou y Triantafilou, 2003)
Coxsackievirus B3	CAR	Clatrina	(Chung et al., 2005)
	DAF y CAR	Caveola ^c	(Coyne y Bergelson, 2006)
	DAF y CAR	Macropinocitosis ^c	(Coyne et al., 2007b)
	HS	Dependiente de pH ácido	(Zautner et al., 2006)
Coxsackievirus B4	CAR y DAF	<i>lipid-raft</i>	(Triantafilou y Triantafilou, 2004)
Ecovirus 1	Integrina $\alpha_2\beta_1$	Caveola	(Marjomäki et al., 2002; Pietiäinen et al., 2004)
		<i>Lipid-raft</i> , no clatrina no caveola ^c , macropinocitosis	(Karjalainen et al., 2008; Liberali et al., 2008a)
Ecovirus 6	DAF	Caveola	(Leveque et al., 2007)
	No DAF	Clatrina	(Leveque et al., 2007)
Ecovirus 11	DAF	<i>Lipid-raft</i>	(Stuart et al., 2002)
	No DAF	Clatrina	(Stuart et al., 2002)
Parecovirus 1	Integrinas $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_3\beta_3$	Clatrina	(Joki-Korpela et al., 2001)
Rinovirus humano 2	LDLR	No clatrina	(Bayer et al., 2001)
		Clatrina	(Snyers et al., 2003)
Rinovirus humano 14	ICAM-1	Clatrina	(DeTulleo y Kirchhausen, 1998; Grunert et al., 1997)
Rinovirus humano 16	ICAM-1	Clatrina	(Lau et al., 2008)
Virus de la fiebre aftosa	Integrina $\alpha_3\beta_3$, $\alpha_3\beta_6$	Clatrina	(Berryman et al., 2005; O'Donnell et al., 2005)
	HS	Caveola	(O'Donnell et al., 2008)
Virus de la poliomielitis	Receptor de poliovirus	Clatrina	(Willingmann et al., 1989)
		No clatrina, no caveola ^c	(Brandenburg et al., 2007; DeTulleo y Kirchhausen, 1998)
		Caveola	(Coyne et al., 2007a)
<i>Coronaviridae</i>			
Virus de la gastroenteritis porcina transmisible	Aminopeptidasa N porcina	Clatrina	(Hansen et al., 1998)
Virus de la peritonitis felina infecciosa	Aminopeptidasa N felina	No clatrina, no caveola	(Van Hamme et al., 2008)
Virus del síndrome respiratorio agudo severo	Enzima convertidor de la angiotensina 2	Clatrina	(Inoue et al., 2007b)
		No clatrina, no caveola	(Wang et al., 2008)
<i>Flaviviridae</i>			
Virus del Dengue		Clatrina	(Acosta et al., 2008; Krishnan et al., 2007; Mosso et al., 2008)
Virus de la diarrea viral bovina	CD46, LDLR	Clatrina	(Grummer et al., 2004; Lecot et al., 2005)
Virus de la hepatitis C	CD81, SR-BI, L-SIGN, DC-SIGN, receptor de la asialoglicoproteína, HS, LDLR	Clatrina	(Blanchard et al., 2006)
Virus del Nilo Occidental	Integrina $\alpha_3\beta_3$	Clatrina	(Chu y Ng, 2004a; Chu y Ng, 2004b; Krishnan et al., 2007)
	No integrina $\alpha_3\beta_3$	<i>Lipid-raft</i>	(Medigeshi et al., 2008)
<i>Togaviridae</i>			
Virus de la encefalitis equina venezolana		Clatrina	(Kolokoltsov et al., 2006)
Virus de la rubeola	Fosfolípidos, glicolípidos	Clatrina y macropinocitosis	(Kee et al., 2004)
Virus del bosque de Semliki	MHC-I	Clatrina	(Helenius et al., 1980)
Virus Sindbis		Clatrina	(DeTulleo y Kirchhausen, 1998)

^a Las familias de virus se han ordenado de acuerdo a Fauquet et al. (2005), y dentro de cada familia los virus se han ordenado alfabéticamente.

^b El término "no clatrina, no caveola" está ha utilizado en sentido amplio, e incluye todas las rutas independientes de clatrina y caveolina. *Lipid-raft* se ha usado cuando se ha establecido la implicación de estas estructuras, pero la función de la caveolina no ha sido demostrada.

^c Independiente de dinamina.

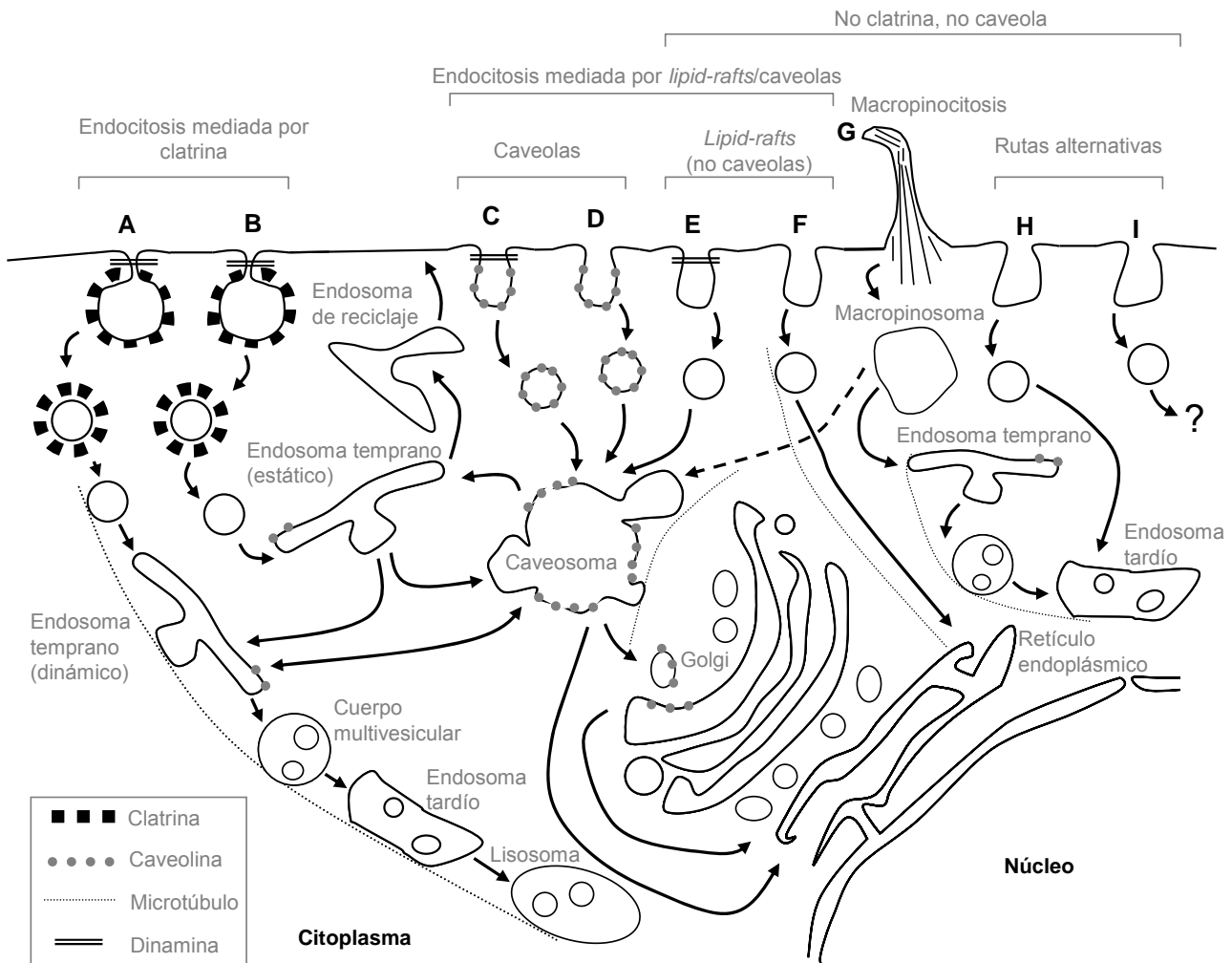


Fig. 1. Rutas de internalización explotadas por virus. Adaptado de Marsh y Helenius (2006).

- A) Endocitosis mediada por vesículas revestidas de clatrina y transporte a endosomas tempranos dinámicos mediado por microtúbulos.
 - B) Endocitosis mediada por vesículas revestidas de clatrina y transporte a endosomas estáticos.
 - C) Endocitosis mediada por caveolas y dependiente de dinamina.
 - D) Endocitosis mediada por caveolas pero independiente de dinamina.
 - E) Endocitosis mediada por *lipid-rafts* independiente de caveolina, pero dependiente de dinamina.
 - F) Endocitosis mediada por *lipid-rafts* independiente de caveolina y de dinamina.
 - G) Macropinocitosis.
 - H) Algunos virus son dirigidos a endosomas tardíos sin pasar por endosomas tempranos.
 - I) Ruta/s alternativa/s todavía no caracterizadas en profundidad, que no cumplen los requisitos de las anteriores.
- Para una descripción detallada de las rutas, consultar el texto.

Los virus han sido utilizados como trazadores de rutas endocíticas, ya que la infección viral es un evento reproducible y fácilmente cuantificable (Pelkmans et al., 2005), permitiendo

caracterizar nuevas rutas de endocitosis e incluso describir conexiones entre orgánulos celulares antes no identificadas (Pelkmans, 2005; Pelkmans y Helenius, 2003). Inicialmente, se distinguieron dos rutas para la entrada de virus basándose en la morfología de las vesículas implicadas: vesículas revestidas de clatrina frente vesículas no revestidas (Marsh y Helenius, 1989). En una reciente revisión, los mismos autores agrupan las rutas de internalización, dependiendo de la maquinaria celular utilizada: macropinocitosis, endocitosis dependiente de clatrina, y endocitosis independiente de clatrina (Marsh y Helenius, 2006). Dentro de este último grupo se incluyen rutas de muy diverso tipo, siendo la ruta de las caveolas la mejor caracterizada. La diversidad de rutas de internalización explotadas por los virus se ilustra en la Fig. 1. Como se comentó anteriormente, virus de diferentes familias pueden utilizar las mismas rutas endocíticas, mientras que dentro de una misma familia e incluso dentro de un mismo género (*i. e.* coxsackievirus) diferentes rutas pueden ser explotadas (Tabla I).

2.2.1 Endocitosis mediada por vesículas revestidas de clatrina

Es el mecanismo de endocitosis asociado a la internalización de virus mejor estudiado hasta el momento (Fig. 1 A y B) y puede operar tanto de manera constitutiva, como inducida en respuesta a mecanismos de señalización celular (Mills, 2007). Recibe el nombre de la observación al microscopio electrónico de invaginaciones de la membrana plasmática caracterizadas por presentar en su cara citoplasmática un revestimiento electrodenso, denominadas fosetas revestidas (*bristle-coated pits*). Este recubrimiento, como el de las púas de un peine se observó también en vesículas intracelulares correspondientes a estadios posteriores a la invaginación de las fosetas revestidas (Roth y Porter, 1964). Asociado a estas estructuras se identificó un componente de naturaleza proteica, denominado clatrina (Pearse, 1976).

La unidad de ensamblaje de la clatrina es denominada trisquelión por su forma al microscopio electrónico (Fig. 2A). Está formado por tres cadenas pesadas (~ 190 kDa) cada una asociada a una cadena ligera (~ 25 kDa) (Fotin et al., 2004b; Kirchhausen y Harrison, 1981; Ungewickell y Branton, 1981). Las patas de diferentes trisqueliones se interdigitan entre sí formando una jaula poliédrica que recubre la vesícula endocítica (Fig. 2B). El diseño de caras pentagonales y hexagonales de este poliedro (en algunos casos heptagonales) recuerda a las costuras de un balón de fútbol (Cheng et al., 2007; Edeling et al., 2006; Heuser, 1980). La observación de mallas hexagonales planas asociadas a la cara interna de la membrana plasmática ha sugerido que esta va curvándose hacia el interior de la célula invaginando la vesícula debido a la introducción de pentágonos en la estructura, aunque esta secuencia de hechos todavía no ha sido demostrada (Brodsky et al., 2001; Kirchhausen, 2000). La actina y proteínas asociadas a ella

Introducción

aportarían la tensión mecánica necesaria en la invaginación de la vesícula, sin embargo la función de la actina no es esencial en células de mamíferos (Boucrot et al., 2006; Brodsky et al., 2001; Engqvist-Goldstein y Drubin, 2003).

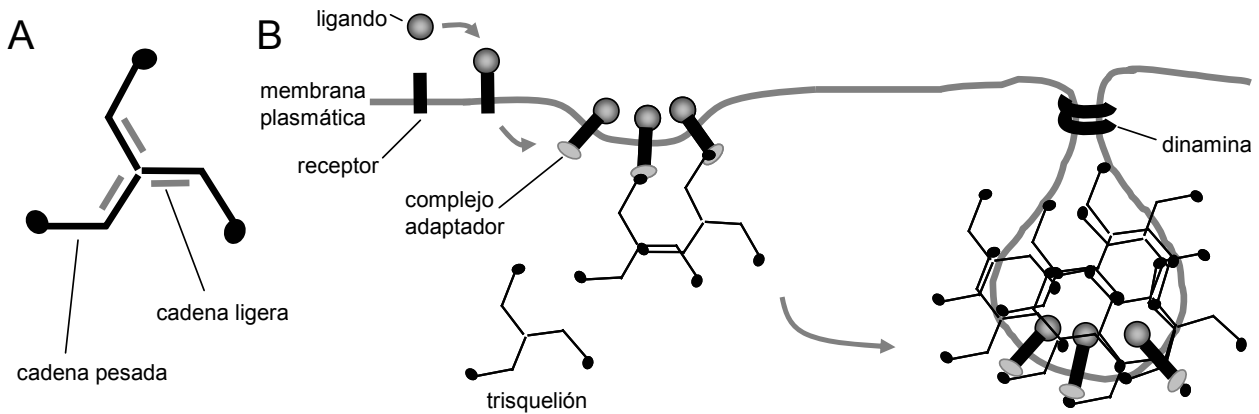


Fig. 2. Estructura de la clatrina y mecanismo de formación de una fosta revestida. Adaptado de Edeling et al. (2006).

A) Representación esquemática de un trisquelión de clatrina. Las cadenas ligeras de la clatrina se representan en gris, y las pesadas en negro.

B) Representación del proceso de creación de una fosta revestida de clatrina. Para una descripción detallada ver el texto. Por simplificación las cadenas ligeras de la clatrina se han omitido.

La interacción de las moléculas de clatrina con el dominio citoplasmático del receptor a internalizar se establece a través de un complejo adaptador multiproteico (Keyel et al., 2006; Kirchhausen, 1999; Owen et al., 2004; Sorkin, 2004). La función de estos adaptadores va más allá de actuar como puente entre la clatrina y el receptor, participando en la inducción de la curvatura de la membrana (Ford et al., 2002; Horvath et al., 2007). Se han descrito diferentes secuencias de aminoácidos localizadas en el dominio citoplasmático de los receptores que median la interacción con adaptadores específicos (Bonifacino y Traub, 2003; Keyel et al., 2006; Traub y Lukacs, 2007). Dada la amplia variedad de adaptadores se ha propuesto el concepto de diversidad dentro la ruta de clatrina (Benmerah y Lamaze, 2007; Lakadamyali et al., 2006; Leonard et al., 2008; Puthenveedu y von Zastrow, 2006). La segregación de ligandos en diferentes poblaciones de vesículas actuaría como mecanismo para reducir la competencia entre ligandos (Puthenveedu y von Zastrow, 2006).

Una vez formada, la vesícula revestida debe escindirse de la membrana plasmática. En este proceso juega un papel fundamental la dinamina, una GTPasa que se asocia al cuello de la vesícula e induce su fisión (Hinshaw, 2000; Macia et al., 2006; van der Blik y Meyerowitz, 1991). La vesícula pierde su revestimiento rápidamente gracias a la intervención de proteínas como la auxilina y Hsc70 (Fotin et al., 2004a), y a continuación fusiona con un endosoma temprano. Los endosomas tempranos son orgánulos tubulovesiculares que actúan como distribuidores de la carga internalizada (Saraste y Goud, 2007). Recientemente, Lakadamyali et al. (2006) han caracterizado dos poblaciones de foseas revestidas de clatrina. Una primera población (dinámica) internaliza ligandos preferentemente destinados a degradación, los cuales son dirigidos a una población de endosomas tempranos asociada a microtúbulos (Fig. 1A), que maduran rápidamente hacia endosomas tardíos y lisosomas. La segunda población (estática) carece de movilidad mediada por microtúbulos y es utilizada por ligandos que preferentemente son dirigidos a endosomas de reciclaje (Fig. 1B). Otros trabajos confirman esta especialización (Leonard et al., 2008). En la elección entre una u otra población de foseas jugaría un papel importante la utilización de adaptadores específicos (Lakadamyali et al., 2006).

El tráfico endosomal está gobernado por GTPasas de la familia Rab (Schwartz et al., 2007) y fosfoinosítidos (De Matteis y Godi, 2004) y se basa en la organización de la membrana endosomal en un mosaico de dominios con diferente contenido de lípidos y proteínas (Gruenberg, 2001). Hay Rabs que se localizan en endosomas tempranos (Rab5), endosomas tardíos (Rab7) y endosomas de reciclaje (Rab11). Para el resto de las funciones de las Rab ver Schwartz et al. (2007). El tránsito de vesículas de unos compartimientos a otros se produce por un intercambio de las GTPasas Rab. Así, al madurar hacia endosomas tardíos, los endosomas tempranos van perdiendo Rab5 y ganando contenido en Rab7 (Rink et al., 2005). A medida que los ligandos progresan en la ruta endosomal hacia los lisosomas, el pH interno de los compartimientos endosomales va acidificándose desde 6.5 en los endosomas tempranos y de reciclaje hasta alcanzar valores en torno a 5.5 - 5.0 en los endosomas tardíos/lisosomas (Yamashiro y Maxfield, 1984). La acidificación se produce gracias al bombeo de protones hacia el lumen del endosoma por las ATPasas vacuolares (V-ATPasas) (Marshansky y Futai, 2008; Yamashiro et al., 1983). Esta acidificación es aprovechada por muchos virus como mecanismo desencadenante de la desencapsidación (apartado 2.3).

La primera asociación de las vesículas revestidas de clatrina con la endocitosis de virus se obtuvo en estudios de microscopía electrónica de la entrada del virus de la estomatitis vesicular (VEV), proceso que inicialmente fue denominado *viropexis* (Simpson et al., 1969). Actualmente, podemos encontrar diferentes ejemplos de virus que utilizan esta ruta de entrada (Tabla I).

Introducción

Gracias a las nuevas técnicas de marcaje basadas en la construcción de proteínas de fusión con derivados fluorescentes de la proteína fluorescente verde (GFP), combinadas con avances técnicos en microscopía de fluorescencia *in vivo* (Rappoport, 2008), se ha podido observar en tiempo real como la maquinaria de endocitosis mediada por clatrina se ensambla alrededor de partículas del virus de la gripe, de reovirus y de VEV. Primero se produce el reclutamiento del adaptador específico y a continuación el ensamblaje de la clatrina, reclutamiento de dinamina y pérdida del revestimientos de clatrina (Chen y Zhuang, 2008; Ehrlich et al., 2004; Johannsdottir et al., 2009; Rust et al., 2004). Se ha visualizado también el transporte mediado por microtúbulos de partículas del virus de la gripe y el virus del bosque de Semliki a través de las distintas poblaciones endosomales (Lakadamyali et al., 2003; Lakadamyali et al., 2006; Vonderheit y Helenius, 2005). Utilizando virus como trazadores, se han descubierto conexiones de la ruta de la clatrina con otras vías endocíticas. Por ejemplo, algunos virus son internalizados por la ruta dependiente de clatrina y a continuación dirigidos desde los endosomas tempranos hacia la ruta de las caveolas (Laniosz et al., 2008; Querbes et al., 2006).

2.2.2 Endocitosis mediada por *lipid-rafts*/caveolas

La membrana plasmática no es un entorno con una composición homogénea continua, sino que contiene microdominios lipídicos también denominados balsas lipídicas (*lipid-rafts*) (Simons y Ikonen, 1997). Los *lipid-rafts* se caracterizaron inicialmente como porciones de la membrana plasmática insolubles a bajas temperaturas (4° C) en detergentes no iónicos (Chamberlain, 2004). Se trata de dominios con un alto contenido en colesterol, glicoesfingolípidos y proteínas ancladas a glicofosfatidilinositol (GPI), proteínas modificadas con grupos mirístico y palmítico, y proteínas transmembrana (Jacobson et al., 2007). También se encuentran en las membranas intracelulares (Rajendran y Simons, 2005). Los *lipid-rafts* no definen en si mismos una ruta endocítica específica, sino que múltiples mecanismos endocíticos pueden internalizarlos, incluyendo vesículas revestidas de clatrina (Chinnapen et al., 2006; Martín-Belmonte et al., 2003; Rollason et al., 2007; Stoddart et al., 2002). Entre los mecanismos endocíticos responsables de internalizar *lipid-rafts* podemos encontrar dos independientes de clatrina. Uno son las caveolas (Fig. 1 C y D), y el otro no ha sido denominado con ningún nombre específico, y es comúnmente referido como endocitosis mediada por *lipid-rafts* (Fig. 1 E y F) (Pelkmans, 2005). Ambas rutas pueden considerarse variantes de una ruta común más amplia denominada *lipid-raft/caveola* (Marsh y Helenius, 2006; Nabi y Le, 2003).

2.2.2.1 Caveolas

Las caveolas fueron descritas como invaginaciones de la membrana plasmática (Palade, 1953). El término caveola hace referencia a su parecido a pequeñas cuevas (Yamada, 1955). Se han definido como invaginaciones de la membrana con forma de matraz (*flask-shaped*), de 60 – 80 nm de diámetro, que pueden aparecer solas o interconectadas entre si y carecen de revestimiento citoplasmático al contrario que las fosetas revestidas de clatrina (Parton y Simons, 2007), aunque es posible distinguir un suave recubrimiento estriado en su cara citoplasmática (Richter et al., 2008; Rothberg et al., 1992). Se encuentran en la membrana plasmática de gran variedad de tipos celulares y tejidos, pero no en todos (Thomas y Smart, 2008). Actualmente, además de por los criterios morfológicos citados anteriormente, las caveolas se definen como una especialización dentro de los *lipid-rafts*, caracterizada por la presencia de una proteína denominada caveolina (Parton y Simons, 2007; Rothberg et al., 1992). Las caveolinas son una familia de proteínas integrales de membrana (21 - 24 kDa) con tres miembros: caveolina-1 (Kurzchalia et al., 1992), caveolina-2 y caveolina-3 (Tang et al., 1996). Las caveolinas 1 y 2 son abundantes en células no musculares, mientras que la caveolina-3 se encuentra en el músculo esquelético y en algunas células de músculo liso (Tang et al., 1996; Way y Parton, 1995). Las tres caveolinas presentan los extremos amino (N) y carboxilo (C) terminal en el citoplasma, unidos por un largo dominio intramembrana en forma de horquilla. La caveolina-1 se une a moléculas de colesterol (Murata et al., 1995) y está modificada por la unión de ácido palmítico en su C-terminal (Dietzen et al., 1995). La asociación física de las caveolinas con los *lipid-rafts* hace que la reducción del contenido de colesterol de la membrana plasmática origine que las caveolas se aplanen y desaparezcan (Rothberg et al., 1992). De esta manera, la extracción de colesterol de la membrana mediante tratamientos farmacológicos se ha utilizado como una herramienta básica a la hora de caracterizar ligandos que son internalizados vía *lipid-raft/caveola*. Sin embargo, la extracción de colesterol no afecta exclusivamente a esta ruta, y puede tener efectos sobre la ruta mediada por clatrina (Rodal et al., 1999; Subtil et al., 1999).

La formación de caveolas implica la oligomerización de la caveolina y su asociación con los microdominios ricos en colesterol (Bauer y Pelkmans, 2006). Los oligómeros de caveolina se ensamblan en el complejo de Golgi, y no parece que se formen *de novo* en la superficie celular (Tagawa et al., 2005), sugiriendo un modelo de caveolas preformadas que cicla entre el Golgi y la membrana plasmática, regulado por quinasas celulares (Coyne y Bergelson, 2006; Pelkmans y Zerial, 2005; Shajahan et al., 2004). La fosforilación por quinasas de la familia Src (quinasas de tirosina del virus de Sarcoma de Rous) de la tirosina 14 de la caveolina-1 está implicada en la internalización de caveolas (Coyne y Bergelson, 2006; del Pozo et al., 2005). Formas de la

caveolina-1 mutada en esta posición actúan como dominantes negativos e impiden la internalización de caveolas (Coyne y Bergelson, 2006; del Pozo et al., 2005). En la internalización de virus a través de caveolas también juegan un papel importante la proteína quinasa C (PKC) (Pietiäinen et al., 2004) y la actina (Coyne y Bergelson, 2006; Pelkmans et al., 2002), aunque también se han descrito rutas independientes de actina (Pietiäinen et al., 2004). La fisión de las caveolas de la membrana plasmática es dependiente de la actividad de la dinamina (Fig. 1C) (del Pozo et al., 2005; Henley et al., 1998; Oh et al., 1998; Pelkmans et al., 2002; Pietiäinen et al., 2004), aunque también se han identificado caveolas internalizadas sin requerir la actividad de la dinamina (Fig. 1D) (Coyne y Bergelson, 2006). Las caveolas internalizadas fusionan con un orgánulo citoplasmático denominado caveosoma, rico en caveolina y, a diferencia de los endosomas, con pH interno neutro (Pelkmans et al., 2004; Pelkmans et al., 2001; Pelkmans et al., 2002). Desde los caveosomas, los ligandos son distribuidos hacia el Golgi, la membrana plasmática, el retículo endoplasmático, y los endosomas tempranos. Las caveolas internalizadas también pueden fusionar con endosomas tempranos de una manera dependiente de Rab5 (Pelkmans et al., 2004). De esta manera, existen virus que son internalizados mediante caveolas y a continuación pueden ser dirigidos hacia la ruta endosomal (O'Donnell et al., 2008; Pelkmans et al., 2004; Smith et al., 2008).

2.2.2.2 Endocitosis mediada por *lipid-rafts* (no caveolas)

Dentro de esta categoría se engloban los mecanismos de internalización dependientes de la función de *lipid-rafts*, pero independientes de caveolina (Fig. 1 E y F). El ecovirus 1 puede ser internalizado en vesículas negativas para caveolina de una manera dependiente de dinamina (Fig. 1E), y a continuación es translocado a los caveosomas (Marsh y Helenius, 2006). El virus de simio 40, en células sin caveolina es internalizado mediante una ruta dependiente de *lipid-rafts* e independiente de caveolas y dinamina (Fig. 1F), dentro de un orgánulo similar a los caveosomas (con pH neutro interior pero sin caveolina). A continuación, es transportado hacia el retículo endoplasmático (Damm et al., 2005). Se han descrito otros ejemplos de rutas basadas en *lipid-rafts* que son independientes de caveolas, aunque por el momento no se han asociado a la entrada de virus (Glebov et al., 2006; Mayor y Pagano, 2007).

2.2.3 Macropinocitosis

La macropinocitosis (Fig. 1G) es un proceso activado por las células para internalizar grandes cantidades de fluidos y otras sustancias (Mayor y Pagano, 2007). La carga es internalizada en una vacuola formada por protrusiones de la membrana plasmática (*ruffles*) (Swanson, 2008). Las vesículas que median este proceso, macropinosomas, normalmente no están revestidas y suelen medir más de 500 nm de diámetro. El proceso es dependiente de la polimerización de actina, mediante la activación de GTPasas Rac y Rho, e independiente de la función de la dinamina (Mayor y Pagano, 2007; Pelkmans y Helenius, 2003; Swanson, 2008). La proteína CtBP1/BARSm juega un papel importante en el sellado de los macropinosomas y es necesaria la actividad de PI3K y PKC, así como la activación de PAK-1 (Amstutz et al., 2008; Karjalainen et al., 2008; Liberali et al., 2008a; Mercer y Helenius, 2008). Los virus internalizados mediante macropinocitosis (ver ejemplos en la Tabla I) pueden ser dirigidos hacia caveosomas o endosomas (Coyne et al., 2007b; Imelli et al., 2004; Karjalainen et al., 2008; Siczarski y Whittaker, 2002a). En el caso del coxsackievirus B3 (CVB3), la internalización se produce mediante un proceso que emplea elementos de las caveolas y la macropinocitosis (Coyne et al., 2007b). El tráfico intracelular de los macropinosomas está gobernado, entre otros, por Rab5 y Rab34 (Coyne et al., 2007b) y, en algunos casos, Rab7 (Swanson y Watts, 1995).

2.2.4 Rutas alternativas

Existen rutas que no se han clasificado dentro de las categorías descritas anteriormente (Fig. 1 H e I). Se pueden agrupar bajo el epígrafe “no clatrina, no caveola” (Siczarski y Whittaker, 2002a), aunque este término estrictamente también incluye la endocitosis mediada por *lipid-rafts* que no implica caveolas (apartado 2.2.2.2) e incluso la macropinocitosis (apartado 2.2.3). Se trata de rutas poco caracterizadas, lo cual hace difícil precisar su número. Un ejemplo es la ruta que sigue el virus de la coriomeningitis linfocítica (Fig. 1H), internalizado independientemente de clatrina y *lipid-rafts*, y transportado a endosomas tardíos de manera independiente de Rab7, sin pasar a través de endosomas tempranos (Quirin et al., 2008; Rojek et al., 2008a). El virus de la gripe puede utilizar otra ruta alternativa además de la endocitosis mediada por clatrina (Lakadamyali et al., 2003; Rust et al., 2004); para el virus de la poliomielitis también se ha descrito un mecanismo de entrada independiente de *lipid-rafts*, y clatrina, pero dependiente de actina (Brandenburg et al., 2007).

2.3 Mecanismos de liberación del genoma utilizados por virus

Para dar lugar a una infección productiva, los virus deben liberar su material genético en el citoplasma de la célula hospedadora. Esta penetración puede tener lugar mediante la fusión de la membrana lipídica del virión, en el caso de los virus con envoltura. Este proceso está mediado por proteínas de superficie denominadas proteínas de fusión, que pueden ser de diferentes tipos (Smith y Helenius, 2004). Los virus sin envoltura, utilizan mecanismos basados en alteraciones de la partícula y exposición de residuos hidrofóbicos (Smith y Helenius, 2004). Tanto la fusión como los cambios conformacionales se inician por bajada de pH o por interacciones con el receptor. Los lugares donde se producen estos procesos de penetración son variados e incluyen endosomas tempranos, endosomas tardíos y el retículo endoplasmático. Algunos virus causan la ruptura de los compartimientos endosomales donde son internalizados, originando su liberación junto a todo el contenido del endosoma, mientras que otros inducen la permeabilización y la formación de poros en la membrana endosomal (Chandran et al., 2002; FitzGerald et al., 1983; Prchla et al., 1994; Prchla et al., 1995; Schober et al., 1998). Se ha descrito la implicación de proteasas celulares residentes en los endosomas, e incluso proteasas presentes en el propio virión, en el proceso de desencapsidación (Greber et al., 1996; Marsh y Helenius, 2006). Para los virus que transitan a través de compartimientos ácidos, la bajada de pH actúa como desencadenante de la fusión o de la desencapsidación (Le Blanc et al., 2005; Marsh y Helenius, 2006; Pelkmans y Helenius, 2003; Smith y Helenius, 2004). Sin embargo, otros virus, como el virus de simio 40, tras su internalización vía caveolas, alcanzan el retículo endoplasmático y allí sufren reacciones de isomerización de puentes disulfuro de la cápsida aprovechando la maquinaria celular de plegamiento y control de calidad de proteínas, presente en este orgánulo (Schelhaas et al., 2007). Otros, como el virus BK, combinan ambas estrategias (Jiang et al., 2009).

2.4 La fiebre aftosa y otras enfermedades vesiculares importantes en Sanidad Animal

2.4.1 La fiebre aftosa

La fiebre aftosa (FA) o glosopeda es una enfermedad vesicular altamente contagiosa que afecta a animales de pezuña hendida (artiodáctilos), entre los cuales se encuentran ovejas, cabras, vacas y cerdos. Se caracteriza por la aparición de lesiones cutáneas, denominadas aftas, en el morro, lengua y patas del animal. Otras enfermedades vesiculares, como la enfermedad vesicular del cerdo, la estomatitis vesicular y el exantema porcino, originan signos clínicos indiferenciables de los de la FA (Grubman y Baxt, 2004; Sáiz et al., 2002; Sobrino et al., 2001). La FA fue descrita en el norte de Italia en el siglo XVI. Los estudios de epidemiología molecular sugieren que a finales del siglo XVII y principios del XVIII se produjeron dos grandes

radiaciones que dieron lugar a las actuales cepas circulantes Euroasiáticas y Sudafricanas. Europa habría actuado como el eje central de la enfermedad desde donde se extendió al resto del mundo (Sobrino et al., 2001; Tully y Fares, 2008). Aunque la enfermedad cursa con una baja tasa de mortalidad en animales adultos, la reducción en la producción ganadera y las restricciones al comercio y exportación de ganado derivadas de su aparición, originan elevadas pérdidas económicas (Cottam et al., 2008; Li et al., 2008; Sobrino y Domingo, 2001; Thompson et al., 2002). Este hecho, unido a que se trata de una de las enfermedades más contagiosas que afectan a los mamíferos, hace de la FA la primera enfermedad incluida en la Lista de la OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal). Actualmente, la enfermedad es endémica en partes de Asia, África Subsahariana, Oriente Medio y América del Sur, aunque también existen focos esporádicos en zonas libres de la enfermedad. Para una información detallada sobre síntomas, procedimientos de diagnóstico y situación actual de la FA y otras enfermedades vesiculares, consultar la página de la OIE (<http://www.oie.int>).

2.4.1.1 El virus de la fiebre aftosa

En 1898, Loeffler y Frosch demostraron que el causante de la FA era un agente infeccioso filtrable más pequeño que una bacteria, primera descripción de un virus responsable de una enfermedad animal (Domingo et al., 1990). Este agente, denominado virus de la fiebre aftosa (VFA), está clasificado actualmente por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) dentro del orden *Picornavirales* en la familia *Picornaviridae*, y constituye la especie tipo dentro del género *Aphthovirus* (Fauquet et al., 2005).

2.4.1.2 Organización genómica del virus de la fiebre aftosa

El material genético de VFA está compuesto por una única molécula de RNA de polaridad positiva, que tiene una longitud de unas 8.2 kb. En el caso del aislado de VFA empleado en esta Tesis, (apartado 4.2), la longitud de su RNA es de 8115 nucleótidos, sin contar los tramos homopoliméricos de polirribocitidilato (poliC) y poliadenilato (poliA), que son heterogéneos en longitud (Escarmís et al., 1996; Escarmís et al., 1992; Toja et al., 1999) (Fig 3). El genoma está compuesto por una región central que contiene un único marco de lectura abierta. Esta región codificante está flanqueada por dos regiones no codificantes localizadas en los extremos 5' y 3', denominadas 5' UTR y 3' UTR (apartado 2.4.1.4). Para una comparación entre diferentes aislados de VFA consultar Carrillo et al. (2005).

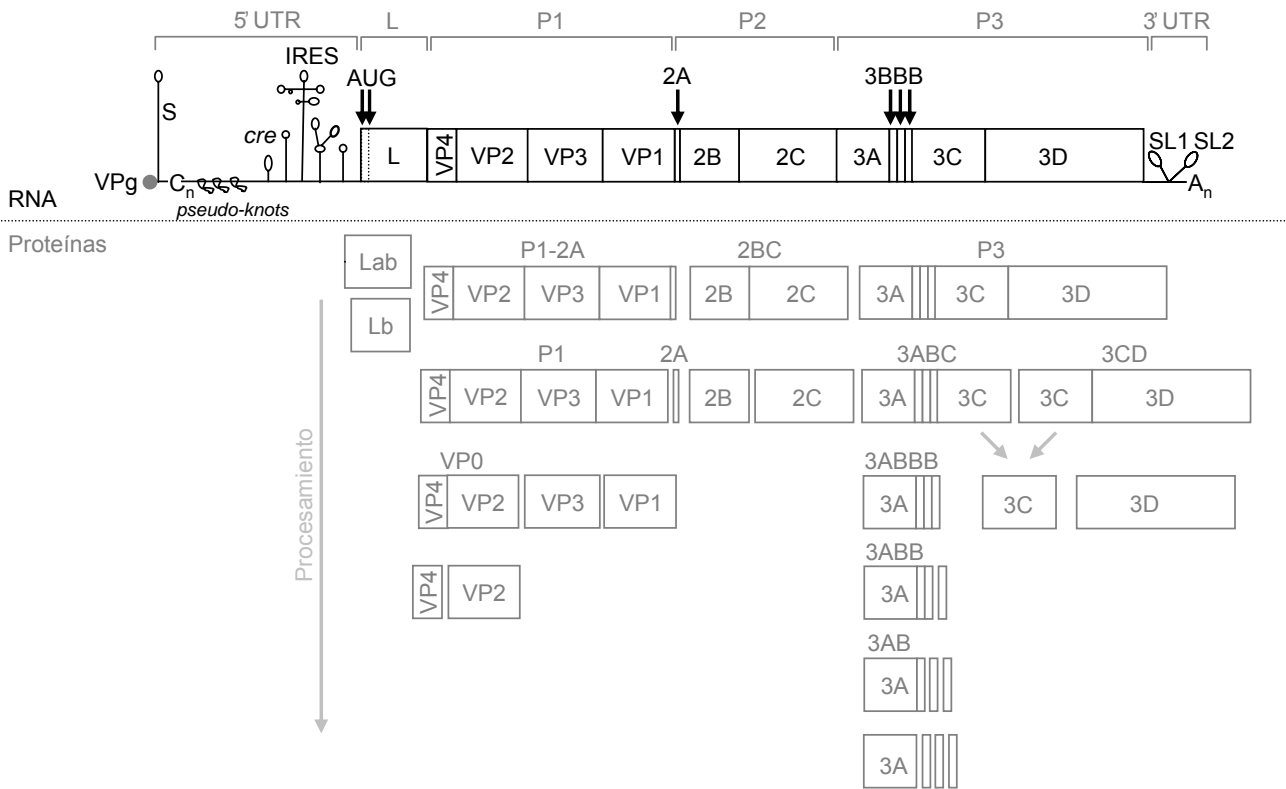


Fig. 3. Organización genómica de VFA y procesamiento proteolítico de la poliproteína viral. El esquema de la parte superior hace referencia a la organización genómica de la molécula de RNA de VFA, indicando la localización del marco de lectura abierta (representado por cajas), flanqueado por las regiones no codificantes 5' y 3', con la proteína 3B (VPg) covalentemente unida en el extremo 5'. C_n y A_n hacen referencia a los tramos de poliC y poliA, respectivamente. En la parte inferior, el esquema representa el procesamiento proteolítico de la poliproteína para dar lugar a los diferentes precursores y proteínas maduras. Para una explicación detallada, consultar el texto. Adaptado de Ryan et al. (2004).

2.4.1.3 Regiones no codificantes

La región 5' UTR juega importantes papeles en la replicación de VFA y en ella se han identificado los siguientes elementos (Fig. 3): fragmento S, poliC, *pseudo-knots*, un elemento replicativo que actúa en *cis* (*cre*) y el sitio de entrada interna del ribosoma (IRES). El fragmento S está implicado en interacciones con factores celulares y en interacciones RNA/RNA con el extremo 3' (Serrano et al., 2006). El elemento *cre* es esencial para la replicación de los picornavirus y contiene un motivo conservado AAACA que funciona como molde para la uridilación de 3B (Nayak et al., 2006). La región IRES está muy estructurada y es la responsable de la traducción del RNA independiente de *cap* (Fernández-Miragall et al., 2009; Martínez-Salas et al., 2008). La región 3' UTR contiene dos *stem loops* (Fig 3) denominados SL1 y SL2,

seguidos de un tramo de poliA, típico de RNA mensajeros celulares. El poliA interviene en el inicio de la síntesis de RNA de polaridad negativa y su eliminación afecta la infectividad del RNA de VFA (Sáiz et al., 2001). El poliA estimula la traducción del RNA viral dependiente del IRES (López de Quinto et al., 2002) y está implicado en la circularización del genoma, mediante interacciones con la región 5' UTR (Serrano et al., 2006). Ambas regiones interactúan con diferentes proteínas celulares (Pacheco et al., 2008; Rodríguez Pulido et al., 2007).

2.4.1.4 Región codificante

La traducción del RNA de VFA se inicia a partir dos tripletes AUG localizados después del IRES y separados entre sí por 84 nucleótidos, siendo más utilizado el segundo (Andreev et al., 2007; Belsham, 1992; López de Quinto y Martínez-Salas, 1999). A medida que la poliproteína es traducida, se generan los distintos precursores y proteínas maduras mediante procesamiento proteolítico, que llevan a cabo proteasas virales (Fig 3). El marco de lectura abierto del RNA viral codifica una única poliproteína dividida en 4 regiones denominadas: L, P1, P2 y P3 (Fig. 3). Las regiones L, P2 y P3 codifican precursores y proteínas maduras no estructurales (apartado 2.4.1.4.2), mientras que la región P1 codifica las proteínas estructurales que componen la cápsida del virión (apartado 2.4.1.4.1).

2.4.1.4.1 Proteínas estructurales: estructura y propiedades de la cápsida; reconocimiento del receptor celular

La cápsida de VFA está formada por 60 copias de cada una de las proteínas estructurales VP1 (1C), VP2 (1B), VP3 (1D) y VP4 (1A). Se ha resuelto mediante cristalografía de rayos X la estructura tridimensional a nivel atómico de la cápsida de aislados de diferentes serotipos de VFA (Acharya et al., 1989; Curry et al., 1996; Curry et al., 1997; Fry et al., 1999; Fry et al., 2005), incluyendo la del aislado C-S8c1 (Lea et al., 1994). Estos trabajos desvelaron una gran similitud estructural entre aislados. Se trata de una cápsida con simetría icosaédrica y un diámetro alrededor de 30 nm. Las proteínas VP1, VP2 y VP3 (~ 23 - 24 kDa) constituyen la superficie externa de la cápsida y comparten una estructura en barril β compuesta por 8 cadenas antiparalelas conectadas entre sí por bucles. La proteína VP4 (~ 9 kDa) se localiza en la cara interna de la cápsida y está unida en su extremo N-terminal covalentemente a un residuo de ácido mirístico (Belsham et al., 1991). La proteína VP4 madura resulta del procesamiento proteolítico del precursor VP0 en VP2 + VP4, que se produce una vez ensamblada la cápsida (Knipe et al., 1997).

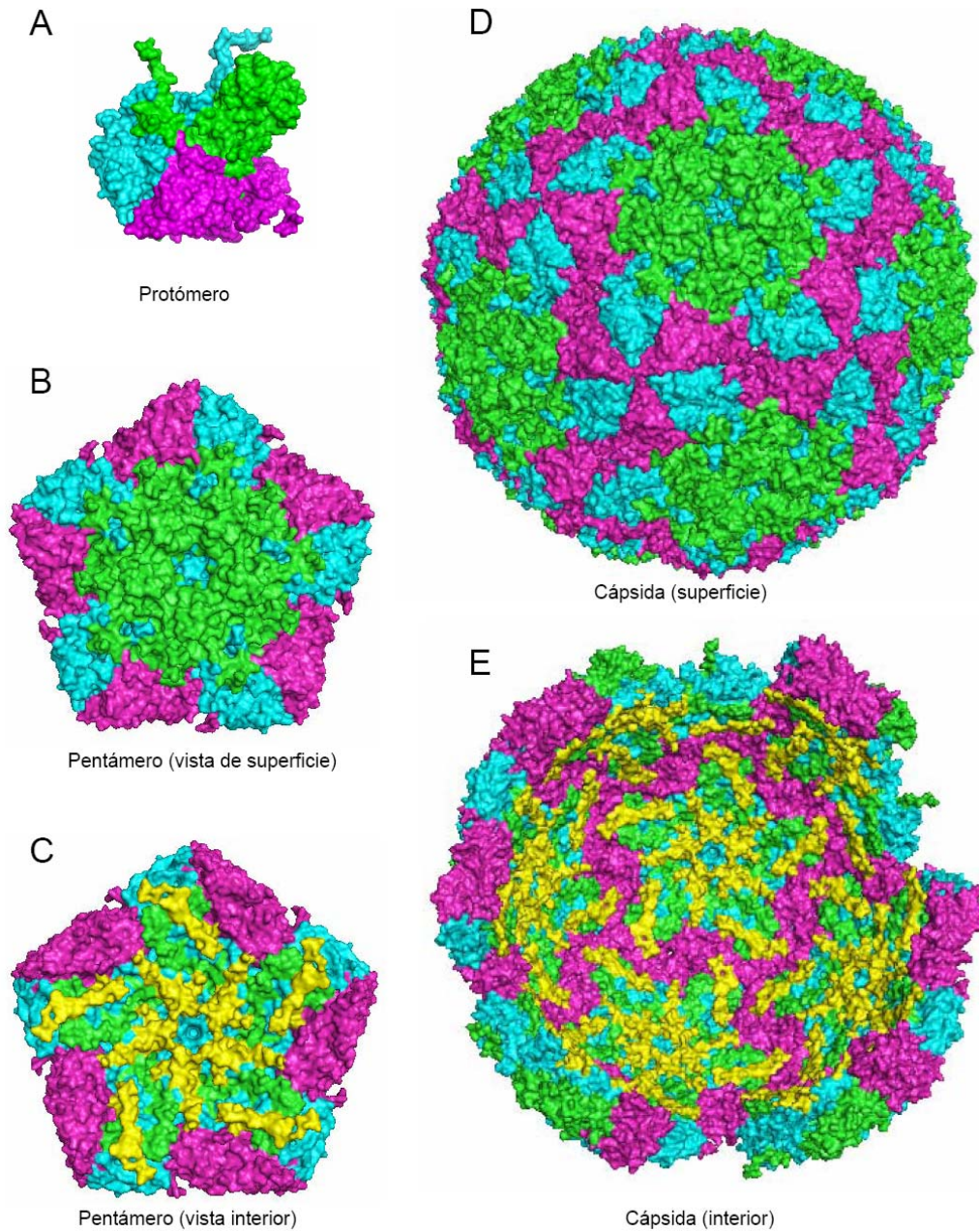


Fig. 4. Representación tridimensional de la estructura de la cápsida de VFA y los intermediarios de ensamblaje. La estructura se basa en las coordenadas atómicas de la cápsida del aislado C-S8c1 (Lea et al., 1994).

La representación de la superficie de la estructura se realizó con el programa PyMol.

A) Vista de superficie del protómero biológico.

B) Vista de superficie externa de una subunidad pentamérica.

C) Vista de la cara interna de una subunidad pentamérica.

D) Vista de superficie de la cápsida completa.

E) Vista interna de la cápsida.

Código de colores: VP1 en verde, VP2 en magenta, VP3 en cian y VP4 en amarillo.

La primera unidad de ensamblaje de la cápsida la constituye el protómero biológico (Fig. 4A) (coeficiente de sedimentación 5 S), formado por una copia de cada una de las cuatro proteínas estructurales. Cinco protómeros se ensamblan dando lugar a un pentámero (Fig. 4B y C) (12 S). Las subunidades pentaméricas constituyen los intermedios de ensamblaje y desensamblaje de la cápsida de VFA. Doce pentámeros se asocian y forman la cápsida (Fig. 4D). La cápsida completa junto con la molécula de RNA tiene un coeficiente de sedimentación de 140 S. En las interfases interpentaméricas existen residuos que participan en puentes de hidrógeno y puentes salinos entre las distintas subunidades que son importantes para la estabilidad de la cápsida (Mateo et al., 2003). A diferencia de lo que ocurre con otros picornavirus, las cápsidas de VFA son extremadamente sensibles a pH ácido (Brown, 1972; Newman et al., 1973). Cerca de las interfases pentaméricas se localiza una gran densidad de residuos de His (pKa 6.8 en solución). Estas His actuarían como sensores de pH para desencadenar el desensamblaje de la cápsida en pentámeros a pH ligeramente ácidos (< 7) (Acharya et al., 1989; van Vlijmen et al., 1998). De especial importancia son las His 142 y 145 de VP3 en el VFA tipo A, que corresponden a las His 140 y 143 en VP3 de C-S8c1 (Curry et al., 1995; Ellard et al., 1999; van Vlijmen et al., 1998). La sensibilidad a pH ácido está implicada en el mecanismo de desencapsidación que utiliza el VFA (apartado 2.4.1.5).

La superficie de la partícula viral no es lisa. Muchos de los bucles que conectan las láminas β entre sí y parte de las láminas β sobresalen de la cápsida. Destaca el bucle G-H de la proteína VP1, comprendido entre las posiciones 138 a 150 (Lea et al., 1994). Se trata de un bucle largo y flexible en cuya porción central (posiciones 141-143) se localiza un triplete Arg Gly Asp (RGD) altamente conservado, que mimetiza la secuencia de interacción de algunos ligandos celulares con moléculas de la familia de las integrinas (Pierschbacher y Ruoslahti, 1984; Takada et al., 2007). Las integrinas son proteínas transmembrana heterodiméricas implicadas en adhesión y señalización celular. Están formadas por la asociación no covalente de una cadena α y una β (Takada et al., 2007). Mediante ensayos de competición con péptidos que contenían el motivo RGD pronto se comprobó el papel funcional de este motivo como ligando viral de unión a receptores celulares (Baxt y Becker, 1990; Fox et al., 1989; Mateu et al., 1996).

Las integrinas constituyen el receptor utilizado por los aislados naturales del VFA para infectar hospedadores naturales (McKenna et al., 1995; Monaghan et al., 2005; Nuñez et al., 2007). Algunas de las posiciones adyacentes al RGD tienen importancia en el reconocimiento del receptor (Burman et al., 2006; Mateu et al., 1996). Hasta el momento se han descrito 5 integrinas capaces de interactuar con el VFA, aunque dentro de estas, el papel funcional de la integrina $\alpha_5\beta_1$ no ha sido demostrado, y sólo las integrinas $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_6$ y $\alpha_v\beta_8$, pueden actuar como

Introducción

receptor para la entrada del virus en células en cultivo (Jackson et al., 2000a; Jackson et al., 2004; Jackson et al., 2002; Jackson et al., 2000b; Neff et al., 1998). Existen diferencias en la utilización de las distintas integrinas entre los serotipos de VFA (Burman et al., 2006; Duque y Baxt, 2003). La $\alpha_v\beta_6$ sería la más importante como receptor (Dicara et al., 2008), además esta integrina se expresa en bovino y ovino en células epiteliales susceptibles a la infección por VFA (Brown et al., 2006; Monaghan et al., 2005). Se han descrito otros receptores, como heparán sulfato (HS), relacionados con la adquisición mutaciones expuestas en la cápsida que confieren cargas positivas (Baranowski et al., 1998; Jackson et al., 1996; Sá-Carvalho et al., 1997). También se han descrito variantes virales capaces de utilizar como receptor moléculas diferentes de HS e integrinas (Baranowski et al., 2000; Zhao et al., 2003). La capacidad de utilización de diferentes receptores celulares en cultivos ha llevado a sugerir que virtualmente cualquier ligando dirigido a los endosomas podría ser utilizado como receptor por el VFA (Mason et al., 1993), propiedad presuntamente unida a su sensibilidad a pH (Ellard et al., 1999).

Las protuberancias de la cápsida conforman sitios antigénicos (Domingo et al., 1999). La variabilidad de secuencia (apartado 2.4.1.6) dentro de estas regiones origina la existencia de siete serotipos (los serotipos euroasiáticos A, O, C y Asia1 junto con los serotipos de los territorios sudafricanos [SAT] SAT1, SAT2 y SAT3) (Domingo et al., 1990). El bucle G-H de la proteína VP1 constituye un sitio antigénico principal compuesto por múltiples epítomos solapantes, denominado sitio A (Mateu et al., 1990). Otros sitios antigénicos son los denominados sitio C, que se localiza en el extremo C-terminal de VP1 y es continuo e independiente del sitio A en C-S8c1 pero no en VFA de serotipo O (Parry et al., 1990), y el sitio D, que es discontinuo y comprende residuos de VP1, VP3 y VP2 (Lea et al., 1994).

2.4.1.4.2 Proteínas no estructurales

La región L codifica dos proteínas solapadas denominadas Lab^{pro} y Lb^{pro}, resultado del inicio de la traducción en cada uno de los dos tripletes AUG funcionales del genoma viral. Se trata de proteasas que actúan tanto en el procesamiento de la poliproteína viral a nivel del corte entre L y P1 (Medina et al., 1993), como en el corte del factor de traducción celular eIF4G (Devaney et al., 1988), originando el cese de la síntesis de proteínas celulares dependiente de *cap*. L^{pro} participa en la degradación de la proteína celular PABP (Rodríguez Pulido et al., 2007), del factor de transcripción NF- κ B y en la inhibición de la síntesis de interferones de tipo I (de Los Santos et al., 2006; de Los Santos et al., 2007).

La región P2 codifica las proteínas maduras 2A^{pro}, 2B, y 2C. Los primeros estudios indicaron que al igual que lo que sucede en otros picornavirus, la proteína 2A^{pro} tiene actividad

proteasa y cataliza en *cis* la excisión del péptido P1-2A (Vakharia et al., 1987), aunque trabajos recientes sugieren que este “corte” es el resultado de un salto en la traducción de la poliproteína originado por un proceso de parada y reiniciación del ribosoma (de Felipe et al., 2003). En la secuencia de las proteínas 2B y 2C se predicen dominios hidrofóbicos y en esta última, también un dominio común a helicasas (Forss et al., 1984). Las proteínas maduras 2B y 2C y su precursor 2BC participan en la formación de las vesículas sobre las que organiza el complejo de replicación del virus, e inhiben la secreción de proteínas celulares (Moffat et al., 2005; Moffat et al., 2007). Esta inhibición sería responsable de la disminución de la expresión de moléculas de MHC de clase I (Sanz-Parra et al., 1998), lo que se ha propuesto como mecanismo de evasión de la respuesta inmune.

La región P3 codifica las proteínas maduras 3A, 3B, 3C^{pro} y 3D^{pol}. La proteína 3A contiene un dominio hidrofóbico y, por analogía con otros picornavirus, podría interactuar con membranas intracelulares, actuando como anclaje del complejo de replicación (Fujita et al., 2007). Cambios en la proteína 3A tienen implicaciones en atenuación y rango de hospedador (Nuñez et al., 2001; Pacheco et al., 2003). La proteína 3B (VPg) participa en la iniciación de la síntesis del RNA viral (Nayak et al., 2005; Nayak et al., 2006). El VFA es el único picornavirus que presenta tres copias no idénticas de esta proteína (Forss et al., 1984). La proteína 3C^{pro} tiene actividad serin-proteasa y cataliza los cortes en la poliproteína viral para dar lugar a las proteínas maduras (Ryan et al., 2004). Su estructura ha sido resuelta mediante cristalografía de rayos X (Birtley et al., 2005). 3C^{pro} es capaz de cortar la histona H3 (Falk et al., 1990) y otras proteínas celulares, como el factor de traducción eIF4G (Li et al., 2001; Strong y Belsham, 2004) y componentes del citoesqueleto celular (Armer et al., 2008). Esta proteína tiene también actividad de unión a RNA y está implicada en la uridilación de 3B (Nayak et al., 2006). La proteína 3D^{pol} es una RNA polimerasa dependiente de RNA (Martínez-Salas et al., 1985), que sintetiza tanto la cadena positiva como la negativa del RNA viral. 3D^{pol} cataliza también la uridilación del péptido 3B, para que éste actúe como iniciador de la síntesis de RNA de polaridad positiva. Su estructura ha sido resuelta mediante cristalografía de rayos X (Ferrer-Orta et al., 2006; Ferrer-Orta et al., 2004; Ferrer-Orta et al., 2007). La baja fidelidad de copia que presenta esta RNA polimerasa es importante para la dinámica poblacional del virus (apartado 2.4.1.6).

2.4.1.5 Interacción con la célula hospedadora

La interacción inicial de la partícula viral se produce con el receptor de superficie. Las estimaciones indican que en torno a 10^3 a 10^4 partículas de VFA podrían unirse por célula (Baxt y Bachrach, 1980). Los aislados de VFA infecciosos *in vivo* utilizan como receptor distintas

Introducción

moléculas de la familia de las integrinas (2.4.1.4.1). Una vez unido al receptor, la partícula viral es internalizada mediante endocitosis. Utilizando aislados virales de serotipos A y O, y células humanas que expresan (constitutivamente o establemente tranfectadas) la integrina $\alpha_v\beta_6$, se ha descrito que las células tranfectadas con una forma dominante negativa del adaptador AP180 (que participa en el ensamblaje del de la clatrina) son infectadas en menor medida que las no tranfectadas. Estos trabajos indican que las partículas de VFA colocalizan con clatrina durante los primeros minutos de la infección, sugiriendo que el virus es internalizado junto a la integrina que utiliza como receptor mediante endocitosis dependiente de clatrina (Berryman et al., 2005; O'Donnell et al., 2005).

Gran variedad de agentes, que bloquean la acidificación de los endosomas, como bases débiles e ionóforos, inhiben la infección de VFA. Esto indica que la liberación del genoma es un proceso dependiente de la acidificación endosomal (Baxt, 1987; Carrillo et al., 1985; Carrillo et al., 1984). Recientemente se ha descrito que las partículas de VFA internalizadas junto con su receptor colocalizan con marcadores de endosomas tempranos y de reciclaje, pero no con marcadores de endosomas tardíos/lisosomas (Berryman et al., 2005; O'Donnell et al., 2008; O'Donnell et al., 2005). Estos datos, unidos a la elevada sensibilidad a pH ácido de los viriones del VFA (apartado 2.4.1.4.1) sugieren que la desencapsidación de VFA tendría lugar dentro de estos compartimientos. Durante el desensamblaje de la cápsida en subunidades pentaméricas, la proteína VP4 es liberada, habiéndose propuesto que esta proteína podría contribuir a la permeabilización de la membrana endosomal, permitiendo la penetración del RNA viral al citoplasma (Knipe et al., 1997).

Como se ha comentado anteriormente, el RNA viral actúa como mensajero y es traducido de manera independiente de *cap* dando lugar al conjunto de proteínas estructurales y no estructurales del virus. A partir de un intermedio replicativo poco caracterizado se sintetiza RNA de polaridad negativa y, a partir de éste, RNA de polaridad positiva. La expresión de las proteínas virales provoca reorganizaciones en la célula hospedadora (apartado 2.4.1.4.2). Estas reorganizaciones incluyen la proliferación de vesículas citoplasmáticas. Aunque el origen de las membranas celulares utilizadas todavía no ha sido precisado, podrían provenir del retículo endoplasmático y/o complejo de Golgi (Knox et al., 2005; Monaghan et al., 2004). La traducción y la replicación de los picornavirus se produce asociada a la superficie de estas vesículas (Bienz et al., 1987). El ciclo viral transcurre en el citoplasma pero observaciones recientes muestran que las proteínas L^{pro} y $3D^{\text{pol}}$ de VFA pueden translocarse al núcleo de la célula infectada (de Los Santos et al., 2007; García-Briones et al., 2006).

2.4.1.6 Variabilidad y dinámica de cuasiespecie

El VFA se caracteriza por presentar una elevada variabilidad genética (Domingo et al., 2003a; Domingo et al., 1990). Las poblaciones de VFA, al igual que las de los virus RNA, son distribuciones dinámicas complejas de mutantes relacionados entre sí, denominadas cuasiespecies virales (Domingo et al., 2006). Dentro de las cuasiespecies existe un complejo equilibrio entre una alta tasa de mutación, inherente a la replicación del RNA y una continua competición reflejada en el mantenimiento de la eficacia biológica (*fitness*). Esta estructura confiere una gran flexibilidad adaptativa a los virus RNA (Domingo y Holland, 1997). Para el VFA, existen distintos ejemplos de cambios fenotípicos notables derivados de cambios genéticos mínimos, incluyendo mutaciones puntuales, como la adquisición de resistencia a anticuerpos monoclonales (Lea et al., 1994), fármacos (Sierra et al., 2007), vacunas peptídicas (Taboga et al., 1997), o cambios en rango de hospedador (Nuñez et al., 2001).

2.4.1.7 Respuesta inmune y vacunas frente al VFA

Existe una buena correlación entre la protección conferida tras la infección con VFA (o la inmunización con sus vacunas inactivadas) y la inducción de niveles altos de anticuerpos circulantes neutralizantes. Esta inducción requiere que linfocitos B reconozcan epítomos de la partícula viral para producir anticuerpos específicos neutralizantes. Además, el reconocimiento de epítomos de linfocitos T tras el procesamiento y presentación antigénica en el contexto de MHC de clase II es importante para este proceso (Collen, 1994). No obstante, existen animales inmunizados que resultan protegidos aun teniendo niveles bajos de anticuerpos neutralizantes. La contribución de otros mecanismos inmunes, como la respuesta celular mediada por MHC de clase I, a la protección frente al VFA están poco estudiadas (McCullough y Sobrino, 2004). Las vacunas basadas en la inactivación química de partículas virales producidas en cultivos celulares son, por el momento, las más efectivas y han permitido erradicar la enfermedad en numerosos países desarrollados. Dentro de este tipo de vacunas, las inactivadas con etilenimina binaria (BEI) ha sustituido progresivamente a las vacunas basadas en la inactivación del antígeno viral con formaldehído (Bahnemann, 1975; Barteling, 2004). A pesar de su eficacia, las vacunas inactivadas convencionales presentan una serie de problemas que hacen que se haya trabajado en diferentes aproximaciones para el desarrollo de nuevas vacunas frente a la FA, como, entre otras, vacunas basadas en péptidos (Cubillos et al., 2008; Taboga et al., 1997) y vacunas atenuadas (Chinsangaram et al., 1998; Mason et al., 1997).

2.4.2 La enfermedad vesicular del cerdo

La enfermedad vesicular del cerdo fue inicialmente descrita en Italia en 1966 (Nardelli et al., 1968). El hecho de producir signos clínicos (aftas) indistinguibles de la FA hace que la OIE la haya incluido dentro de la lista de enfermedades de obligada declaración. A diferencia de la FA, sólo afecta a cerdos. Tras el primer brote en Italia, se han descrito brotes en un gran número de países de Europa y el este de Asia. Exceptuando Italia, donde la enfermedad es endémica, se considera Europa actualmente libre de la enfermedad, habiéndose detectado un solo caso aislado en Portugal en 2007 (Brocchi et al., 1997; Knowles et al., 2007; Lin y Kitching, 2000).

2.4.2.1 El virus de la enfermedad vesicular del cerdo

El agente etiológico de la enfermedad vesicular del cerdo es el virus de la enfermedad vesicular del cerdo (VEVC) (Nardelli et al., 1968). Está clasificado en la familia *Picornaviridae*, dentro del género *Enterovirus*, en la especie *Enterovirus humano B*, junto a algunos coxsackievirus y ecovirus (Fauquet et al., 2005). El VEVC presenta una elevada homología antigénica y de secuencia con el coxsackievirus humano B5 (CVB5) y se considera que su origen sería el salto de especie del CVB5 de humano a cerdo (Zhang et al., 1999; Zhang et al., 1993).

2.4.2.2 Organización genómica de VEVC

La organización general del genoma de VEVC es similar a la de VFA (ver Fig. 3), aunque presenta diferencias características de los enterovirus (Inoue et al., 1989; Inoue et al., 1993; Seechurn et al., 1990). Su RNA, de 7.4 kb, contiene un único marco de lectura abierta flanqueado por dos regiones no codificantes que se organizan como las de poliovirus y coxsackievirus (Shaw et al., 2005; van Ooij et al., 2006). A diferencia de VFA, el marco de lectura abierto está dividido sólo en tres regiones denominadas P1 (codifica las proteínas VP4, VP2, VP3 y VP1), P2 (2A^{pro}, 2B y 2C) y P3 (3A, 3B, 3C^{pro} y 3D^{pol}). El genoma de VEVC no codifica L^{pro}, y codifica una única copia de la proteína 3B (Lin y Kitching, 2000).

2.4.2.3 Proteínas estructurales: estructura, propiedades de la cápsida y reconocimiento del receptor celular

Como la de VFA, la cápsida de VEVC está constituida por 60 copias de cada una de las proteínas estructurales (VP1 - VP4) (Delagneau et al., 1975). La estructura atómica de la cápsida de dos aislados de VEVC ha sido resuelta mediante cristalografía de rayos X, incluyendo la del aislado utilizado en esta Tesis Doctoral SPA/1/93 (Fry et al., 2003; Verdaguer et al., 2003). Se trata de una cápsida icosaédrica con un diámetro medio de 26 nm, constituida por la asociación

de doce subunidades pentaméricas (Fig. 5A y B). Durante el proceso de encapsidación, el corte del precursor VP0 de VEVC en VP4 + VP2 es esencial para generar partículas infecciosas (Rebel et al., 2003). La cápsida de VEVC (Fig. 5C) es muy estable dentro de un rango amplio de pH (2.5 - 12) (Fry et al., 2003). Al igual que en otros enterovirus, se han descrito cambios conformacionales desencadenados por la unión con el receptor, que producen la externalización del extremo N-terminal de VP1, localizado en una posición interna de la cápsida en las partículas virales libres (Jiménez-Clavero et al., 2001).

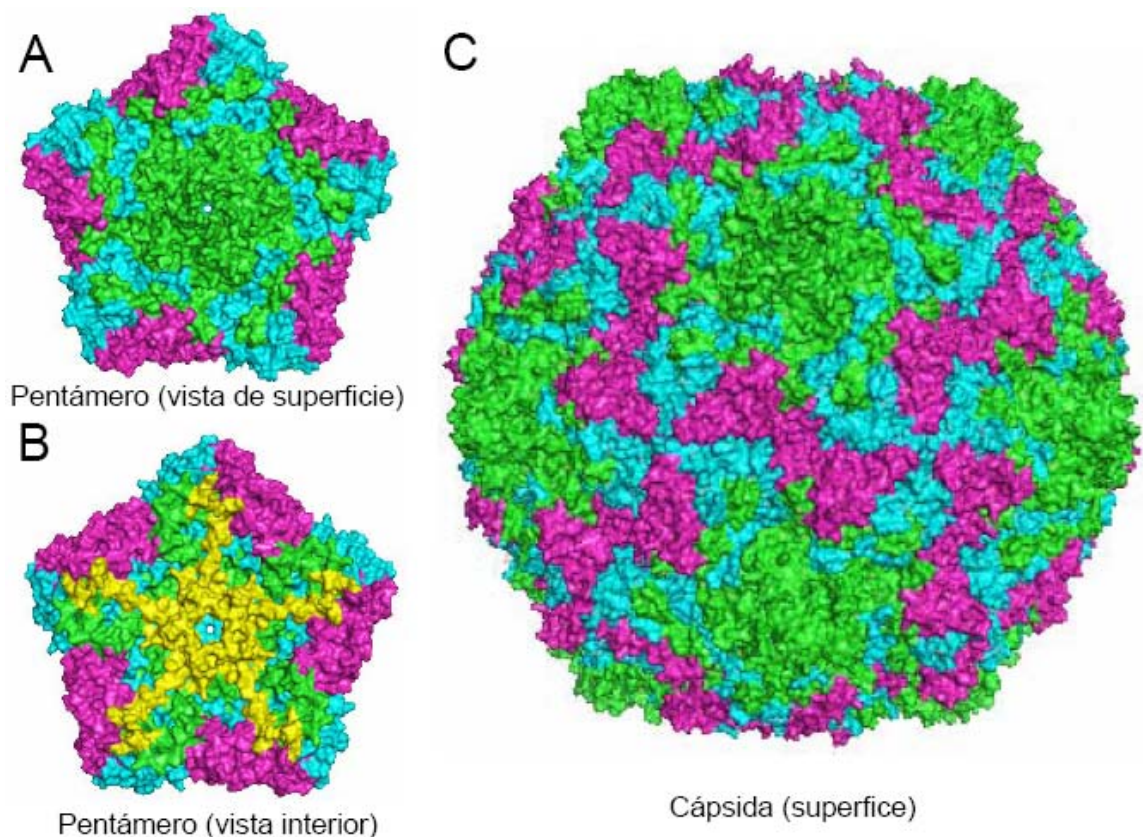


Fig. 5. Representación tridimensional de la estructura de la cápsida de VEVC. La estructura se basa en las coordenadas atómicas de la cápsida del aislado SPA/1/93 (Verdaguer et al., 2003). La representación de la superficie de la estructura se realizó con el programa PyMol.

A) Vista de superficie de la subunidad pentamérica.

B) Vista de la cara interna de la subunidad pentamérica.

C) Vista de superficie de la cápsida completa.

Código de colores: VP1 en verde; VP2 en magenta, VP3 en cian y VP4 en amarillo.

Como receptor celular, el VEVC puede utilizar HS, el receptor de coxsackievirus y adenovirus (CAR), así como DAF (*decay accelerating factor*); aunque la capacidad de unir DAF sólo se observa en los aislados cronológicamente más antiguos. El aislado SPA/1/93 tiene

capacidad de unión a HS y a CAR, pero no a DAF (Escribano-Romero et al., 2004; Jiménez-Clavero et al., 2005a). En coxsackievirus relacionados, la unión de CAR desencadena cambios conformacionales en la cápsida que implican la liberación de la proteína VP4 al exterior, originando partículas alteradas o partículas A (Milestone et al., 2005). La externalización del extremo amino terminal sería requisito previo a la liberación de VP4 y la formación de las partículas A (Jiménez-Clavero et al., 2001). La liberación de VP4 se relaciona con la permeabilización de las membranas celulares y el mecanismo de penetración del genoma viral en el citoplasma (Danthi et al., 2003). La cápsida de VEVC está caracterizada antigénicamente, habiéndose identificado distintos sitios neutralizantes, uno de ellos compartido con CVB5 (Borrego et al., 2002a; Borrego et al., 2002b; Jiménez-Clavero et al., 2000).

2.4.2.4 Interacción con la célula hospedadora

La interacción de VEVC con la célula hospedadora está poco caracterizada. La interacción inicial del virus se produce con su receptor, que desencadena el cambio conformacional en la cápsida. Tanto el mecanismo de entrada dentro de la célula, como las reacciones que median la penetración del RNA viral en el citoplasma no han sido caracterizados por el momento. Se especula que podrían ser similares a las que utilizan otros picornavirus, pero estos usan múltiples mecanismos de entrada (Tabla I).

Por carecer de L^{pro}, muchas de sus funciones son asumidas por 2A^{pro} y 3C^{pro} (Whitton et al., 2005). Cambios en 2A^{pro} de VEVC se relacionan con alteraciones en la patogenia de la enfermedad (Inoue et al., 2007a). Al igual que para otros picornavirus, la replicación tiene lugar en el citoplasma de las células en estructuras vesiculares. Aunque no existen estudios sobre la organización del complejo de replicación de VEVC, las proteínas 2B, 2C y 3A de coxsackievirus se localizan en el complejo de Golgi y median la inhibición de la ruta de secreción de proteínas (Cornell et al., 2006; Wessels et al., 2005), con la consecuente inhibición de la expresión de moléculas de MHC de clase I (Cornell et al., 2007). A diferencia de lo que ocurre con VFA, la proteína 3A de enterovirus es capaz de interactuar con factores de intercambio de nucleótidos de guanosina (GEF) como GBF1 implicados en el transporte vesicular en el complejo de Golgi (Belov et al., 2007; Wessels et al., 2006a; Wessels et al., 2006b). Estas diferencias explicarían la sensibilidad diferencial al tratamiento con brefeldina que manifiestan los enterovirus frente al VFA, que es resistente a esta droga (Monaghan et al., 2004; O'Donnell et al., 2001). En contraste con el VFA, las reordenaciones del sistema de endomebranas celulares que desencadenan los enterovirus originan multitud de vesículas de doble membrana (Monaghan et al., 2004) relacionadas con procesos de inducción de autofagia (Jackson et al., 2005).

2.4.3 La estomatitis vesicular

La estomatitis vesicular es una enfermedad viral que afecta a multitud de especies animales, entre ellas caballos, vacas, cerdos e incluso humanos. Produce signos clínicos indistinguibles de la FA y su distribución geográfica está limitada al continente americano (Letchworth et al., 1999; Rodríguez, 2002).

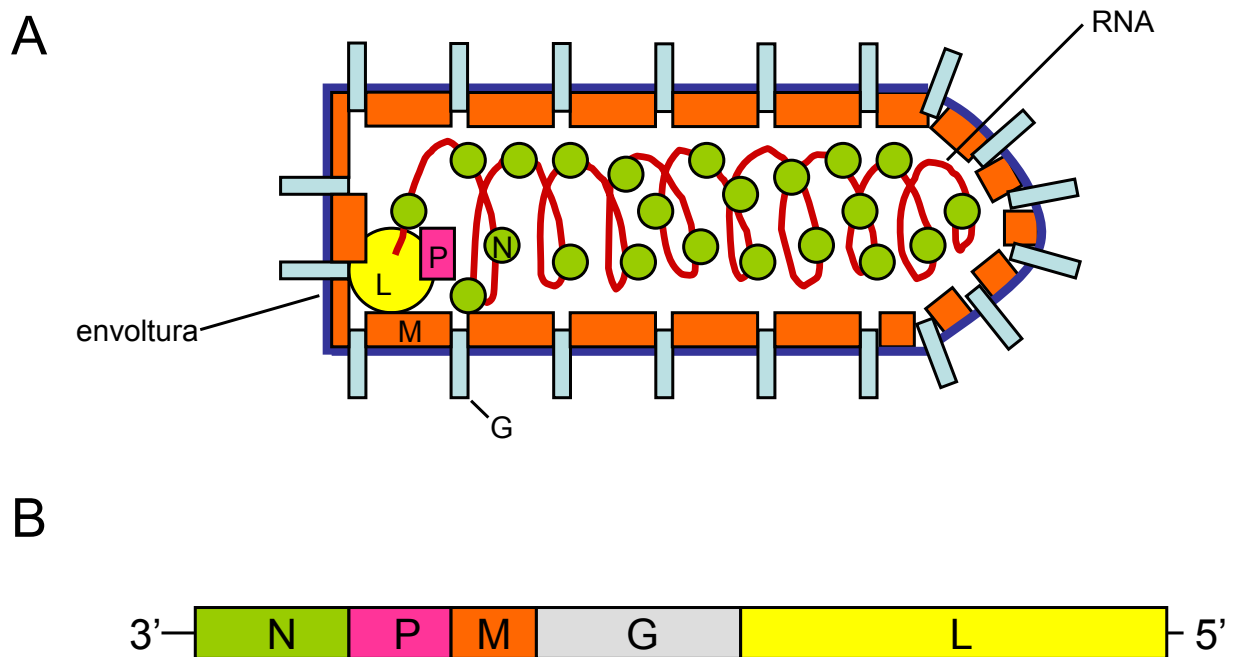


Fig. 6. Representación esquemática de una partícula de VEV y de su organización genómica. Adaptado de Lichty et al. (2004).

A) Partícula de VEV. En rojo la molécula de RNA, en naranja la proteína de la matriz (M), en azul claro la glicoproteína (G). La proteína L y la P, incluidas dentro del virión se indican en rosa y verde respectivamente. La envoltura lipídica del virión se indica en azul oscuro.

B) Organización genómica del RNA de polaridad negativa de VEV. Las regiones que codifican las distintas proteínas virales se indican como cajas con diferentes colores. Para una descripción sobre la función de cada una de las proteínas, consultar el texto.

2.4.3.1 El virus de la estomatitis vesicular

El agente etiológico de la estomatitis vesicular es el virus de la estomatitis vesicular (VEV), incluido en el orden *Mononegavirales*, en la familia *Rhabdoviridae*, dentro del género *Vesiculovirus*, siendo la especie tipo VEV Indiana (Fauquet et al., 2005). Los viriones tienen forma de bala (Fig. 6A), de en torno a 180 nm de longitud y 80 nm de diámetro, y poseen una envoltura lipídica que recubre una nucleocápsida proteica interna donde se localiza el material genético viral, compuesto por una molécula simple de RNA de polaridad negativa (11 kb). El

Introducción

genoma codifica cinco proteínas principales: nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), proteína de la matriz (M), glicoproteína (G), y proteína *large* (L) (Fig. 6B). La proteína G es transmembrana y se localiza en la envoltura del virión. La proteína M conforma la nucleocápsida y juega múltiples papeles durante la replicación. La proteína N se encuentra asociada al RNA viral, y las proteínas L y P catalizan la replicación del RNA viral. Para una descripción detallada de las funciones de las proteínas de VEV consultar (Albertini et al., 2008; Letchworth et al., 1999; Lichty et al., 2004).

2.4.3.2 Interacción con la célula hospedadora

El contacto inicial de VEV se produce con la superficie de la célula hospedadora a través de la proteína G. Como receptor, VEV utiliza lípidos cargados negativamente, como la fosfatidilserina (Schlegel et al., 1983), aunque estudios recientes ponen en duda esta hipótesis (Coil y Miller, 2004). El VEV es internalizado mediante endocitosis mediada por vesículas revestidas de clatrina, siendo uno de los modelos clásicos para el estudio de la internalización de virus mediante esta ruta (Matlin et al., 1982; Simpson et al., 1969; Sun et al., 2005; Superti et al., 1987). Recientemente se ha descrito que este proceso es dependiente de dinamina, e independiente del complejo adaptador AP-2 (Johannsdottir et al., 2009). La partícula viral es transportada hacia los endosomas tempranos y endosomas tardíos. La acidificación de los compartimientos endosomales provoca un cambio conformacional en la proteína G, que origina la fusión de la envoltura viral con las membranas endosomales (Roche et al., 2008; Roche et al., 2006; Roche et al., 2007). Algunos estudios sugieren que el material genético es liberado desde los endosomas tempranos (Sieczkarski y Whittaker, 2003); sin embargo, los últimos datos indican que este proceso podría ocurrir en los endosomas tardíos o cuerpos multivesiculares de transporte (Le Blanc et al., 2005). Una vez liberada la nucleocápsida, tiene lugar la síntesis de proteínas virales y replicación del material genético. Los viriones maduros se ensamblan en la membrana plasmática y salen de la célula por gemación. La proteína G es sintetizada en el retículo endoplasmático y transportada a lo largo del complejo de Golgi, y desde ahí a la membrana plasmática, por lo que ha sido utilizada ampliamente como trazador en estudios de tráfico a través de estos compartimientos (de Silva et al., 1990; Oda et al., 1990).

Objetivos

3. Objetivos

Los objetivos de esta Tesis Doctoral han sido:

1. Caracterizar de la ruta endocítica que utiliza el VFA de serotipo C, C-S8c1, para infectar líneas celulares (BHK-21 e IBRS-2) habitualmente empleadas para el crecimiento del virus, con especial atención al estudio del papel funcional de la clatrina y de la acidificación endosomal.
2. Aislar y caracterizar mutantes de C-S8c1 resistentes a inhibidores de la acidificación endosomal (NH₄Cl).
3. Aislar y caracterizar mutantes de C-S8c1 con resistencia incrementada a pH ácido.
4. Las vacunas convencionales frente al VFA utilizan virus inactivados químicamente. Para su mejor caracterización se decidió evaluar la capacidad de entrada dentro de las células en cultivo de las partículas de C-S8c1 inactivadas.
5. Caracterizar la ruta endocítica que utiliza el VEVC (SPA/1/'93) para infectar células en cultivo, realizando un estudio comparativo con VFA (C-S8c1) y VEV (Indiana). Estos tres virus son responsables de las principales enfermedades vesiculares animales.
6. Estudiar la organización del complejo de replicación de VEVC, realizando un estudio comparativo, análogo al anterior, con VFA y VEV.

Materiales y Métodos

4. Materiales y Métodos

4.1 Cultivo de células eucarióticas

Las líneas celulares empleadas fueron:

-BHK-21: fibroblastos de riñón de hámster sirio dorado (*Mesocricetus auratus*) (Stoker y Macpherson, 1964) procedentes de la ATCC.

-BHKasc (BHK21-tTA/anti-CHC): línea derivada de células BHK-21 establemente transfectadas con un RNA antisentido frente a la cadena pesada de la clatrina, cuya transcripción se encuentra bajo el control de un represor inducido por tetraciclina (Iversen et al., 2003). Estas células fueron amablemente cedidas por K. Sandvig (Norwegian Radium Hospital, Noruega).

-IBRS-2: células de riñón de cerdo (*Sus scrofa*) (De Castro, 1964), amablemente cedidas por E. Blanco (CISA-INIA).

-CHO: células procedentes de ovario de hámster chino (*Cricetulus griseus*) (Puck et al., 1958), amablemente cedidas por M. Sáiz (CBM “Severo Ochoa”).

Las células BHK-21, IBRS-2 y CHO se crecieron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco) -suplementado con 100 U/ml de penicilina (Sigma), 100 µg/ml de estreptomina (Sigma), 2 mM L-glutamina (Gibco) y 5% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco)- a 37° C en una atmósfera con 7% de CO₂ y 98% de humedad. Las células BHKasc (Iversen et al., 2003) fueron mantenidas en DMEM completo suplementado con 10% SFB, 200 µg/ml geneticina (Gibco), 0.5 µg/ml puromicina (Sigma) y 2 µg/ml tetraciclina (Sigma). Para inducir la expresión del RNA antisentido, las células se sembraron 72 h previas a la realización de los experimentos en presencia (control) o ausencia de tetraciclina (inducción).

Las células fueron almacenadas nitrógeno líquido tras un proceso de congelación lenta en una mezcla de 90% SFB y 10% DMSO (Sigma). Para su descongelación se introdujeron en un baño a 37° C y tras una centrifugación a 250 × g durante 5 min (para eliminar el SFB y el DMSO) se distribuyeron en placas de cultivo de tejidos en medio completo con 10% de SFB. Una vez alcanzada la confluencia, las células fueron despegadas de las placas utilizando una mezcla de 0.05 mg/ml tripsina (Difco) y 0.016% EDTA (Merck) y sembradas en placas nuevas a la dilución deseada (subcultivo o pase).

4.2. Virus

Los diferentes aislados de VFA utilizados fueron:

-C-S8c1: clon biológico de VFA obtenido mediante triple purificación de placa a partir del aislado natural C Santa Pau Sp/70 (Santa Pau, Girona 1970), representativo del subtipo europeo (C₁) del serotipo C de VFA (Sobrino et al., 1983).

-C-S8c1p213MARLS (denominado MARLS a lo largo de esta Tesis Doctoral): es un mutante de escape al anticuerpo monoclonal (AcM) SD6 -dirigido frente al bucle G-H de la proteína VP1 de la cápsida de VFA (Mateu et al., 1990)-, seleccionado a partir de la población C-S8c1p123 [C-S8c1 pasado 213 veces en células BHK-21 (Charpentier et al., 1996)]. Las mutaciones seleccionadas en C-S8c1p213MARLS con respecto al virus C-S8c1 parental, han sido descritas previamente (Baranowski et al., 1998). Este virus fue amablemente cedido por M. Herrera y E. Domingo (CBM “Severo Ochoa”).

El VEVC utilizado fue el aislado SPA/1/93, procedente de un cerdo infectado en Lérida en 1993 (Espuña et al., 1993; Jiménez-Clavero et al., 1998), que fue amablemente cedido por M. A. Jiménez-Clavero y V. Ley (SIGYT-INIA).

El enterovirus bovino (EVB) (Jiménez-Clavero et al., 2005b) utilizado fue amablemente cedido por J. C. Sáiz (SIGYT-INIA).

El VEV utilizado fue VEV Indiana (de la Torre et al., 1985), amablemente cedido por M. Dávila y E. Domingo (CBM “Severo Ochoa”).

4.3 Plásmidos (clones infecciosos)

Los clones infecciosos que expresan el genoma completo del VFA empleados fueron:

- **pMT28**: codifica el RNA genómico del aislado C-S8c1 (García-Arriaza et al., 2004). Este clon infeccioso fue amablemente cedido por C. Escarmís (CBM “Severo Ochoa”). La numeración de los nucleótidos del genoma de VFA utilizada corresponde a la descrita para C-S8c1 por Toja et al. (1999) (Número de acceso GenBank: AJ133357).

-**pMT28-VP3 118V** (este y los restantes plásmidos fueron construidos a partir de pMT28, ver apartado 4.14): contiene la sustitución de nucleótido C2903T que codifica el cambio de aminoácido VP3 A118V.

-**pMT28-VP3 118V/VP1 47D**: contiene las sustituciones de nucleótido C2903T y A3346G que codifican los cambios de aminoácido VP3 A118V y VP1 N47D, respectivamente. También lleva la sustitución silenciosa silenciosa C3117T.

-**pMT28-VP1 47D**: contiene la sustitución de nucleótido A3346G que codifica el cambio de aminoácido VP1 N47D, y la sustitución silenciosa C3117T.

-pMT28-VP1 17D: contiene la sustitución de nucleótido A3256G que codifica el cambio de aminoácido VP1 N17D, y la sustitución silenciosa C3117T.

4.4 Infecciones virales

Los procedimientos para la realización de infecciones, tanto en medio líquido como semisólido se describen en Baranowski et al. (1998) y Sobrino et al. (1983).

4.4.1 Infección en medio líquido

Las monocapas celulares fueron lavadas dos veces con DMEM e infectadas con la multiplicidad de infección (m.d.i.) -definida como unidades formadoras de placa por ml (UFP/ml)- elegida. Durante la primera hora de infección las placas fueron agitadas cada 15 min. Transcurrido este período de tiempo, el inóculo fue retirado y se añadió medio fresco con SFB al 5%. En los experimentos indicados, los viriones del VFA extracelulares fueron inactivados mediante lavado con tampón salino fosfato (PBS) pH 6.0, seguido de dos lavados con DMEM para neutralizar el pH extracelular. Las infecciones se realizaron a 37° C.

4.4.2 Infección en medio semisólido

4.4.2.1 Titulación de virus total y de virus extracelular

Para titular la producción viral total (virus en sobrenadante más virus intracelular), las placas conteniendo las células infectadas fueron congeladas y descongeladas tres veces para asegurar una rotura de las membranas celulares y la liberación al medio del virus intracelular. Tras una centrifugación a 22000 × g durante 5 min para eliminar los restos celulares, el sobrenadante fue titulado como se describe a continuación. La titulación de virus extracelular se llevó a cabo a partir de sobrenadante de células infectadas.

La titulación de los diferentes virus se realizó infectando por duplicado monocapas de células BHK-21 (en el caso de VFA, VEV y EVB) o IBRS-2 (en el caso de VEVC) crecidas en placas de 6 pocillos de 35 mm de diámetro. Para ello se realizaron diluciones seriadas de las suspensiones virales con las que se infectaron monocapas cercanas a confluencia de acuerdo a lo descrito en el apartado 4.4.1. Tras la primera hora de infección, se retiró el inóculo y se añadió medio semisólido (0.5% agar, 1-2% SFB dependiendo del grado de confluencia y 0.045 mg/ml DEAE-dextrano en DMEM). Transcurridas 24 h en el caso de VFA y VEV, o 48 h en el caso de VEVC y EVB, las células se fijaron con una solución de 2% formaldehído al durante 15 min y se tiñeron con una solución de 2% cristal violeta en formaldehído al 2% (alternativamente con 0.02% cristal violeta en 10% etanol y 2% paraformaldehído). Las placas fueron lavadas con agua

para retirar el exceso de cristal violeta y se dejaron secar al aire. Una vez secas, se contaron las placas de lisis formadas.

4.4.2.2 Clonaje biológico

Las monocapas de células BHK-21 subconfluentes fueron infectadas en medio semisólido según lo descrito en el apartado anterior y placas de lisis bien aisladas fueron picadas utilizando una punta de micropipeta. Los virus recuperados fueron resuspendidos en 500 μ l de DMEM. A continuación, los virus fueron amplificados mediante infección en medio líquido.

4.5 Tratamientos farmacológicos

Las monocapas celulares fueron lavadas dos veces con DMEM, y tratadas con el mismo medio sin suero con los diferentes inhibidores farmacológicos indicados en la Tabla II, como se describe a continuación.

Las células se preincubaron 30 min con Bisindolmaleimida I (Bis) (disolvente: DMSO, concentración de uso: 5 μ M), brefeldina A (BFA) (DMSO, 5 μ g/ml), citocalasina D (Cit D) (DMSO, 1 μ M), filipina (DMSO, 1 μ g/ml), dinasora (DMSO, 80 μ M), genisteína (DMSO, 100 μ M), nocodazol (DMSO, 40 μ M), wortmanina (DMSO, 200 nM), clorpromazina (Cpmz) (DMEM, 30 μ M), ortovanadato de sodio (OV) (H_2O , 1 mM), manteniendo el fármaco durante todo el período de infección. Excepto la dinasora, que fue sintetizada por H. E. Pelish y amablemente cedida por T. Kirchhausen (Harvard Medical School, EEUU), el resto de las drogas anteriormente mencionadas fueron adquiridas a Sigma. En el caso de PP2 (Calbiochem; DMSO, 10 μ M) las células se preincubaron 1 h y el PP2 se mantuvo durante toda la infección. Para el tratamiento con NH_4Cl (Merck; H_2O , 25 ó 50 mM) las células fueron preincubadas 1 h con el medio con NH_4Cl suplementado con 25 mM HEPES pH 7.4, manteniendo el fármaco durante toda la infección. Para el tratamiento con metil- β -ciclodextrina (M β CD) (Sigma; DMEM, 10 mM) y α -ciclodextrina (α CD) (Sigma; DMEM, 10 mM), las células fueron preincubadas sólo durante 30 min previos a la infección. Para el tratamiento con sacarosa (Merck; DMEM, 0.45 M) y concanamicina A (Con A) (Sigma; DMSO, 100/1000 nM), las células se preincubaron durante 30 min y el fármaco se mantuvo durante la primera hora de infección. En todos los casos, tras la primera hora de infección, el inóculo viral fue retirado y se añadió DMEM con SFB (ver apartado 4.4.1), manteniendo o no los fármacos según lo indicado anteriormente, excepto en el caso de la dinasora, que se une a las proteínas del suero y pierde actividad (Macia et al., 2006), por lo que en este caso toda la infección se desarrolló en medio sin suero.

Cuando los fármacos se aplicaron postinfección (p.i.) para determinar sus posibles efectos sobre la replicación viral, estos se añadieron 3 h p.i. y se mantuvieron hasta el final de la infección (Bis, cit D, filipina, dinasora, genisteína, nocodazol, wortmanina, Cpmz, OV, NH₄Cl) o fueron retirados tras 30 min (M β CD y α CD) o tras 1.5 h (sacarosa y Con A). En todos los casos, las células control se trataron de la misma manera, utilizando el mismo volumen del disolvente empleado con cada droga. Las concentraciones empleadas de los fármacos no tuvieron efectos significativos sobre la viabilidad celular (estimada mediante tinción vital con azul Tripán (Sigma) y observación de las células en campo claro).

Tabla II. Inhibidores farmacológicos utilizados

Compuesto	Efecto	Referencias
Bis	Inhibe la actividad de PKC	(Toullec et al., 1991)
BFA	Desensambla el complejo de Golgi	(Niu et al., 2005; Peyroche et al., 1999)
Cit D	Despolimeriza microfilamentos de actina	(Cooper, 1987)
Con A	Inhibe la actividad de las V-ATPasas y la acidificación de endosomas/lisosomas	(Drose y Altendorf, 1997)
Cpmz	Inhibidor del ensamblaje del revestimiento de clatrina	(Wang et al., 1993)
Dinasora	Inhibe la dinamina	(Macia et al., 2006)
Filipina	Secuestra colesterol e inhibe formación de caveolas	(Orlandi y Fishman, 1998; Schnitzer et al., 1994)
Genisteína	Inhibe quinasas de Tyr	(Akiyama et al., 1987)
Lovastatina	Inhibe la hydroximetilglutaril-coenzima A reductasa y reduce los niveles de colesterol	(Alberts et al., 1980)
M β CD	Extrae colesterol de la membrana plasmática	(Kilsdonk et al., 1995; Shvartsman et al., 2006)
NH ₄ Cl	Neutraliza el pH ácido dentro de endosomas/lisosomas	(Ohkuma y Poole, 1978)
Nistatina	Secuestra colesterol e inhibe formación de caveolas	(Chen y Norkin, 1999; Schnitzer et al., 1994)
Nocodazol	Despolimeriza microtúbulos	(Lee et al., 1980)
OV	Inhibe fosfatasa de Tyr	(Huyer et al., 1997)
PP2	Inhibe quinasas de Tyr de la familia Src	(Hanke et al., 1996)
Sacarosa	Inhibidor del ensamblaje del revestimiento de clatrina	(Heuser y Anderson, 1989)
Wortmanina	Inhibe la actividad de PI3K	(Powis et al., 1994; Wymann et al., 1996)
α CD	Análogo de M β CD que no extrae colesterol de la membrana plasmática	(Shvartsman et al., 2006)

4.6 Evaluación del efecto de los fármacos sobre los procesos endocíticos

4.6.1 Internalización de transferrina

Para validar el efecto de los inhibidores de la endocitosis empleados en el estudio, se empleó transferrina (TF), que es endocitada vía clatrina (Hanover et al., 1984; Miller et al., 1991). Las células crecidas sobre cubreobjetos (Menzel-Glässer, Thermo Scientific) y sometidas a los diferentes tratamientos fueron incubadas 5 min a 37° C con 10 μ g/ml de TF acoplada a Alexa Fluor (AF) 488 (Molecular Probes, Invitrogen) en DMEM con 0.5% seroalbúmina bovina (BSA). Posteriormente, las células se lavaron con 0.2 M ácido acético y 0.2 M NaCl y, a continuación, con 150 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 7.4, 10 mM glucosa, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂ y 1 mM

CaCl₂ para eliminar la TF extracelular (Lukacs et al., 1997). Tras dos lavados con PBS, las células se fijaron en 4% paraformaldehído en PBS. La fluorescencia debida a aldehídos libres fue eliminada mediante la incubación con 1 M glicina en PBS. Las imágenes se tomaron en las mismas condiciones para las células control y las tratadas con los inhibidores farmacológicos.

4.6.2 Tinción con filipina

El contenido relativo de colesterol en las células tratadas con M β CD fue estimado mediante tinción con filipina (Keller y Simons, 1998). Las células crecidas sobre cubreobjetos y tratadas con M β CD fueron fijadas 30 min en hielo, teñidas 15 min a temperatura ambiente con 125 μ g/ml de filipina, y montadas en Fluoromount G (Southern Biotechnology Assoc.).

4.6.3 Tinción vital con naranja de acridina

El marcaje fluorescente de los orgánulos ácidos fue realizado empleando una tinción vital con naranja de acridina (NA), que emite fluorescencia roja cuando se protona y acumula en el interior de vesículas ácidas (Al-Younes et al., 1999). Las células crecidas sobre cubreobjetos fueron tratadas 1 h con NH₄Cl en DMEM conteniendo 25 mM HEPES pH 7.4. Tras este pretratamiento, las células se incubaron en el mismo medio conteniendo 5 μ g/ml de NA, durante 10 min a 37° C. A continuación, fueron lavadas tres veces con el mismo medio sin NA y observadas en un microscopio de fluorescencia utilizando el filtro que permite la excitación simultánea de la fluoresceína y rodamina (Al-Younes et al., 1999).

4.7 Inmunodetecciones

4.7.1 Anticuerpos

La relación de anticuerpos primarios empleados frente a los diferentes virus y estructuras celulares se muestra en la Tabla III.

Los anticuerpos secundarios anti-Ig de ratón o de conejo acoplados a AF 488, 555, 594 ó 647 empleados en las inmunofluorescencias fueron adquiridos de Molecular Probes (Invitrogen). Los anticuerpos secundarios anti-Ig de ratón o de conejo acoplados a peroxidasa empleados en los *western blots*, se adquirieron de GE Healthcare.

4.7.2 Inmunofluorescencia indirecta

Las células crecidas sobre cubreobjetos de vidrio fueron lavadas con PBS antes de ser fijadas en 4% de paraformaldehído en PBS durante 15 min a temperatura ambiente (t.a.)

(alternativamente durante la noche a 4° C). En el caso de la tinción de *cis*-Golgi, las células se fijaron con metanol frío durante 10 min. Después de tres lavados con PBS, las células fueron bloqueadas y permeabilizadas durante 15 min con PBTG (1% BSA, 0.1% Tritón-X 100 y 1 M glicina en PBS). A continuación, se incubaron durante 1 h en cámara húmeda con los correspondientes anticuerpos primarios diluidos en 1% BSA en PBS. Tras lavar con PBS tres veces, las preparaciones se incubaron 30 min con los anticuerpos secundarios adecuados diluidos en 1% BSA en PBS, en las condiciones anteriores. A continuación, las células fueron lavadas de nuevo tres veces con PBS. Cuando se realizaron tinciones de la F-actina, se utilizó faloidina acoplada a AF488 (Molecular Probes, Invitrogen), que fue incluida junto con los anticuerpos secundarios. Seguidamente, los núcleos fueron teñidos con 1 µg /ml DAPI (4'-6 diamidina-fenilindol) (Molecular Probes, Invitrogen) durante 5 min, o con To-Pro 3 (Molecular Probes, Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante. Tras tres lavados con PBS, los cubreobjetos fueron montados sobre portaobjetos de vidrio (Menzel-Glässer, Thermo Scientific), utilizando Fluoromount G (Southern Biotechnology Assoc.) como medio de montaje. Estas preparaciones se almacenaron en oscuridad a 4° C hasta ser observadas con el microscopio.

Tabla III. Relación de anticuerpos primarios empleados

Anticuerpo	Antígeno	Especie	Tipo ^a	Referencia/Compañía
SD6	Sitio A VFA	Ratón	AcM	(Mateu et al., 1990)
5C4 (VFA) ¹	Sitio D VFA	Ratón	AcM	(Lea et al., 1994)
2C2 ¹	3A VFA	Ratón	AcM	(De Diego et al., 1997)
163	3A VFA	Conejo	AcP	(Rosas et al., 2008)
2H12 ¹	VP1 VEVC	Ratón	AcM	(Borrego et al., 2002a)
5C4 (VEVC) ¹	VP3 VEVC	Ratón	AcM	(Borrego et al., 2002a)
N-ter ²	VP1 VEVC	Conejo	AcP	(Jiménez-Clavero et al., 2001)
Anti-2C ³	2C CVB3	Conejo	AcP	Whitton et al. (Sin publicar)
Anti-2BC ³	2BC CVB3	Conejo	AcP	(Cornell et al., 2006)
Anti-3A ³	3A CVB3	Conejo	AcP	(Cornell et al., 2006)
I1 ⁴	Glicoproteína (G) del VEV	Ratón	AcM	(Lefrancois y Lyles, 1982)
J2	RNA de doble cadena (dsRNA)	Ratón	AcM	English & Scientific Consulting
196	Tubulina βII	Conejo	AcP	(Armas-Portela et al., 1999)
DM1A	Tubulina α	Ratón	AcM	Sigma
AC-15	Actina β	Ratón	AcM	Sigma
25H8 ⁵	gp74 (<i>cis</i> -Golgi)	Ratón	AcM	(Alcalde et al., 1994)
1D3	Proteín-disulfuro isomerasa (PDI)	Ratón	AcM	Stressgene
Anti-calreticulina	Calreticulina	Conejo	AcP	Abcam
Anti-EEA1	EEA1 (endosomas tempranos)	Ratón	AcM	BD Transduction Laboratories
Anti-EEA1	EEA1 (endosomas tempranos)	Conejo	AcP	Cell Signaling
Anti-caveolina	Caveolina-1	Conejo	AcP	BD Transduction Laboratories
Anti-fosfocaveolina	Fosfo-Tyr 14 de la caveolina-1	Ratón	AcM	BD Transduction Laboratories
Anti-clatrina	Cadena pesada de la clatrina	Conejo	AcP	Santa Cruz Biotechnology

^a AcM: anticuerpo monoclonal. AcP: anticuerpo policlonal

¹ Cedido por E. Brocchi (IZSLER, Italia)

² Cedido por M. A. Jiménez-Clavero y V. Ley (SIGYT-INIA)

³ Cedido por J. L. Whitton (Scripps Research Institute, EEUU)

⁴ Cedido por M. Dávila y E. Domingo (CBM "Severo Ochoa")

⁵ Cedido por I. V. Sandoval (CBM "Severo Ochoa")

4.7.3 Transferencia e inmunodetección de proteínas: *western blot*

Las células crecidas en placas de 35 mm de diámetro fueron lisadas en hielo con tampón de lisis NP-40 (20 mM HEPES pH 7.4, 10 mM EGTA, 2.5 mM MgCl₂, 1% NP-40), suplementado con 1 mM PMSF (fenilmetilsulfonilfluoruro) y cocktail inhibidor de proteasas (Roche), recogidas con un barredor, sonicadas brevemente y mezcladas con tampón de carga de Laemmli (Laemmli, 1970). Cuando se requirió cargar la misma concentración de proteínas, esta fue determinada previamente para cada muestra mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). Las proteínas se separaron electroforéticamente en condiciones desnaturizantes en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS). Se utilizaron geles discontinuos de poliacrilamida compuestos por un gel concentrador con 5% poliacrilamida (BioRad), seguido por un gel separador con 12% poliacrilamida (7.5% en el caso de la detección de la cadena pesada de la clatrina). Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Protran, Whatman). La membrana se bloqueó con 3% leche desnatada (Nestlé) en PBS durante 45 min, fue lavada tres veces 5 min con PBS-Tween (0.5% Tween 20 en PBS) e incubada con el anticuerpo primario diluido en 1% BSA en PBS toda la noche a 4° C. Tras tres lavados con PBS-Tween las membranas se incubaron los anticuerpos secundarios apropiados acoplados a peroxidasa durante 1 h y fueron lavadas de nuevo tres veces con PBS-Tween. Las membranas se revelaron utilizando un kit de detección quimioluminiscente (Perkin Elmer) en una película de autorradiografía (Agfa).

4.8 Microscopía óptica

4.8.1 Microscopía de fluorescencia convencional

Para la observación de las muestras se empleó un microscopio de epifluorescencia BX61 (Olympus) -objetivos 60×/AN 1.25, 100×/AN 1.3- equipado con los filtros de excitación adecuados y una cámara digital DP70 (Olympus). Se utilizó el software DPController 1.1.1.65 (Olympus) para adquirir las imágenes. Alternativamente, se empleó un microscopio Axioskop (Zeiss) equipado con un objetivo Plan-Neofluar 63× (AN 1.25) acoplado a una cámara digital Coolsnap FX monocroma (Roper Scientific), usando el programa RS Image 1.9.2 (Roper Scientific). Las imágenes fueron procesadas utilizando Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems Inc.).

4.8.2 Microscopía de fluorescencia confocal

Para la observación de las muestras se utilizó un microscopio Axiovert S100 TV (Zeiss) acoplado a un sistema confocal Radiance 2000 (Bio-Rad), utilizando un objetivo Plan-

Apochromat 63× (AN 1.4). Las imágenes fueron adquiridas con el software Lasersharp2000 5.2 (Bio-Rad). Alternativamente, se utilizó un microscopio de barrido láser confocal LSM510 META acoplado a un microscopio invertido Axiovert200 (Zeiss) (objetivo Plan-Apochromat 63×/AN 1.4). Las imágenes fueron adquiridas con el software Zeiss LSM510 4.2 Sp2 (Zeiss). El grosor de las secciones analizadas en el caso de los estudios de colocalización fue de aproximadamente 0.7 μm para el confocal BioRad y de 1 au (*airy unit*) en el confocal LSM510 META. Las imágenes fueron procesadas utilizando los programas ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>), LSM Image Browser 4.2.0.121 (Zeiss) y Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems Inc.).

4.9 Microscopía electrónica

4.9.1 Microscopía electrónica en células infectadas

Las células crecidas en placas de cultivo de tejidos de 100 mm de diámetro fueron procesadas siguiendo el protocolo convencional de inclusión en resina epoxi (Renau y Megías, 1998). Una vez transcurrido el período de infección deseado, las células fueron lavadas tres veces con PBS y fijadas durante 30 min a 37° C en 4% paraformaldehído y 2% glutaraldehído en tampón 0.1 M cacodilato sódico (pH 7.4) suplementado con 5 mM CaCl_2 . Tras tres lavados con el mismo tampón, las células fueron raspadas de la placa y postfijadas con 1% tetróxido de osmio y 1% ferrocianuro potásico a 4° C durante 1 h. A continuación, se lavaron tres veces con H_2O bidestilada y se trataron 1 min con 0.15% ácido tánico en tampón fosfato 0.1 M pH 7.4. Tras un lavado con el mismo tampón y dos con H_2O destilada, las células fueron teñidas con 2% acetato de uranilo durante 1 h a t.a. A continuación, se lavaron tres veces con H_2O bidestilada y se deshidrataron en una serie decreciente de disoluciones de etanol (50%, 75%, 90%, 95% y tres veces en etanol al 100%) durante 5 - 10 min en cada una. Seguidamente, fueron incluidas en la resina epoxi TAAB 812 (TAAB Laboratories). Para ello, primero se infiltraron en una mezcla de resina:etanol 1:2 (1 h a t.a.), después 1:1 (1 h a t.a.), y a continuación en resina 100% (toda la noche a 4° C), seguido de un nuevo cambio de resina 100% (2 h). Las muestras fueron encapsuladas y polimerizadas durante 48 h a 60° C. Los cortes transparentes a los electrones (70 - 80 nm de grosor) fueron realizados con un ultramicrotomo Ultracut E (Leica) y montados en rejillas perforadas de cobre recubiertas de colodión y sombreadas con carbono (G200, Gilder). Para la observación de las muestras se utilizó un microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM-1010 (Jeol) operado a un voltaje de aceleración de 80 kV y equipado con una cámara digital Bioscan 792 (Gatan). Para la adquisición de las imágenes se empleó el programa DigitalMicrograph (Gatan).

4.9.2 Tinción negativa de viriones purificados

La tinción negativa de los viriones purificados de VFA inactivado químicamente (apartados 4.17 y 4.18) se realizó de acuerdo a lo descrito (García-Arriaza et al., 2004). Una gota de la muestra fue adsorbida a la cara ionizada de una rejilla durante 3 min. A continuación, la muestra se fijó con 2% glutaraldehído y se tiñó con 2% acetato de uranilo durante 50 s. Por último, la muestra fue secada al aire y observada al microscopio electrónico.

4.10 Aislamiento de mutantes resistentes a NH_4Cl

Los mutantes de VFA resistentes a NH_4Cl fueron seleccionados mediante clonaje biológico (apartado 4.4.2.2) en presencia de NH_4Cl (Fig. 7). Para ello, se infectaron células BHK-21 con diluciones seriadas del aislado C-S8c1 de VFA. Tras la primera hora de infección, se retiró el inóculo viral y se añadió medio semisólido (apartado 4.4.2.1) suplementado con 25 mM HEPES pH 7.4 y 25 mM NH_4Cl . Tras 30 h de infección en medio semisólido, se picaron tres placas de lisis (denominadas c1, c2 y c3) y se reinocularon en medio líquido con NH_4Cl . Los virus recuperados de estas placas de lisis fueron amplificados mediante dos pases seriados en células BHK-21, manteniendo el NH_4Cl .

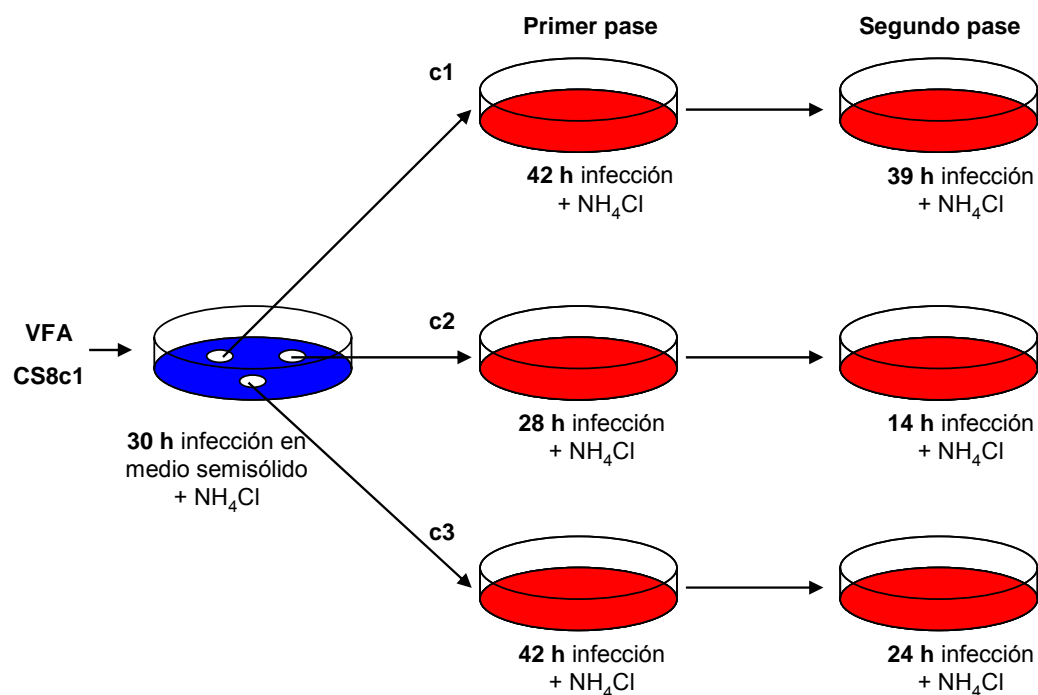


Fig. 7. Estrategia de aislamiento de mutantes resistentes a NH_4Cl .

Tras infección en medio semisólido (azul) en presencia de 25 mM NH_4Cl , se picaron tres placas, que fueron amplificadas mediante dos pases seriados en medio líquido (rojo), manteniendo la misma concentración de NH_4Cl . Los tiempos indican el momento en que los virus fueron recogidos (máximo efecto citopático).

4.11 Aislamiento de mutantes con resistencia a pH ácido incrementada

Estos mutantes de VFA se aislaron mediante clonaje biológico siguiendo una modificación del protocolo descrito por Twomey et al. (1995). En primer lugar se incubaron 10^6 UFP de C-S8c1 (en 50 μ l) con 300 μ l de tampón salino fosfato pH 6 (50 mM NaPO_4 y 140 mM NaCl). Transcurridos 30 min a t.a., el pH fue neutralizado añadiendo 100 μ l de tampón Tris 1 M pH 7.6. Las muestras así preparadas se utilizaron para infectar monocapas subconfluentes de células BHK-21 crecidas en placas de 35 mm de diámetro. Después de 48 h de infección en medio semisólido se picaron 6 placas de lisis (denominadas m1 - m6). Los virus recuperados de estas placas de lisis fueron amplificados mediante infección en medio líquido (primer pase). A continuación, los virus del primer pase fueron tratados de nuevo con pH 6, como se ha descrito anteriormente, y amplificados de nuevo mediante infección en medio líquido (segundo pase).

4.12 Determinación de la sensibilidad diferencial a pH ácido

La sensibilidad diferencial a pH ácido se determinó mediante una modificación del método descrito por Knipe et al. (1997). Para ello, 2×10^6 UFP de cada virus (en 10 μ l) fueron mezcladas con 300 μ l de tampón salino fosfato (50 mM NaPO_4 y 140 mM NaCl) de distinto pH (desde 7.6 hasta 6.0). Tras una incubación de 30 min a t.a., el pH fue neutralizado añadiendo 100 μ l de tampón Tris 1 M pH 7.6. Las muestras fueron inoculadas en monocapas de células BHK-21 y transcurridas 24 h de infección en medio semisólido se determinó el número de UFP desarrolladas.

4.13 Amplificación y secuenciación de ácidos nucleicos

4.13.1 Extracción de RNA vírico

El RNA de VFA fue extraído a partir de 100 μ l de sobrenadante de cultivo infectado, utilizando TRI Reagent (Sigma) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El RNA se resuspendió en 15 μ l de H_2O tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) y fue almacenado a -70°C hasta su utilización.

4.13.2 Obtención de cDNA y su amplificación por RT-PCR

El DNA complementario al molde de RNA (cDNA) fue sintetizado utilizando la transcriptasa inversa MuLV (Roche) del virus de la leucemia Moloney de ratón. El cDNA fue amplificado mediante PCR utilizando la DNA polimerasa BioTaq (Bioline) en combinación con un 10% de la polimerasa Expanded High Fidelity (Roche) que presenta actividad correctora de

errores. Para la amplificación completa de la región P1 del genoma de VFA se realizaron dos reacciones de PCR solapantes, utilizando como molde el cDNA sintetizado. En la primera se emplearon los cebadores 961s y 2310a. En la segunda reacción se emplearon los cebadores SB5 y 3946a. La secuencia nucleotídica y la posición de los oligonucleótidos iniciadores utilizados en las reacciones de PCR se indica en la Tabla IV. El tamaño y pureza de los fragmentos de DNA amplificados se determinó por electroforesis en gel de agarosa (1.5%) en tampón TAE (Tris-acetato sódico-EDTA) y tinción con bromuro de etidio.

Tabla IV. Oligonucleótidos cebadores utilizados

Región ^a	Cebador	Secuencia ^b	Orientación ^c	Posición ^d
5' UTR	961s	AAGCGCTCGGTTTAAAAAGC	s	961
VP4	1788a	TTCATTGGAGCCTCCACTGATGG	a	1788
VP4	SB5	ACCTCTACACACACAACCAACACC	s	1804
VP2	2310a	GTACTTTTCCCTGTCACTGATGTC	a	2310
VP3	mut2903s	CGACCGACGCGAAAGTTCGGTACATGGTGGCG	s	2888
VP3	VP3-HSF	CGCGAAAGCTCGGTACATGGTGGCG	s	2895
VP3	mut2903a	CGCCACCATGTACCGAACTTTCGCGTCGGTCCG	a	2919
VP3	VP3-HSR	CTAGCGTCCACAGGTAGCCGGAGC	a	3200
2A	SB6	CTCCACATCTCCAGCCAACTTGAGCA	a	3870
2B	3946a	GCATCTGGTTAATTGTCTCCACC	a	3946

^a Región genómica de VFA a la que corresponde el oligonucleótido (Fig. 3).

^b La posición marcada en negrita indica el nucleótido mutado respecto a la secuencia correspondiente de C-S8c1.

^c Orientación del oligonucleótido iniciador: s significa sentido (de la misma polaridad que el RNA genómico de VFA); a significa antisentido (de la polaridad complementaria al RNA genómico de VFA).

^d Posición en el genoma de VFA de acuerdo a lo descrito por Toja et al. (1999) del nucleótido en el extremo 5' del oligonucleótido.

4.13.3 Purificación y cuantificación de productos de PCR

El exceso de cebadores fue eliminado utilizando el kit comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación de DNA se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa y espectrofotometría UV, utilizando un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Nanodrop).

4.13.4 Secuenciación de DNA

El DNA amplificado fue secuenciado automáticamente en la Unidad de Genómica de Parque Científico de Madrid, utilizando un secuenciador multicapilar ABI Prism 3100, 3700, o 3730 (Applied Biosystems). Para ello se emplearon los cebadores: 961s, 1788a, SB5, 2310a, VP3-HSF, VP3-HSR, SB6 y 3946a (Tabla IV) y el kit Big Dye Terminador Cycle Sequencing (Abi Prism, Perkin Elmer). Las secuencias fueron determinadas a partir de al menos dos reacciones de secuenciación independientes. En los casos en los que se observó mezcla de nucleótidos en una misma posición del cromatograma, las proporciones aproximadas de las

diferentes bases fueron estimadas mediante integración del área bajo cada pico. Para ello se imprimió el cromatograma ampliado y se pesó el pico correspondiente a cada una de las bases detectadas en esa posición.

4.14 Clonaje molecular

Los diferentes clones infecciosos derivados de pMT28 (apartado 4.2.2), y los sitios de restricción empleados para su clonaje están esquematizados en la Fig. 8.

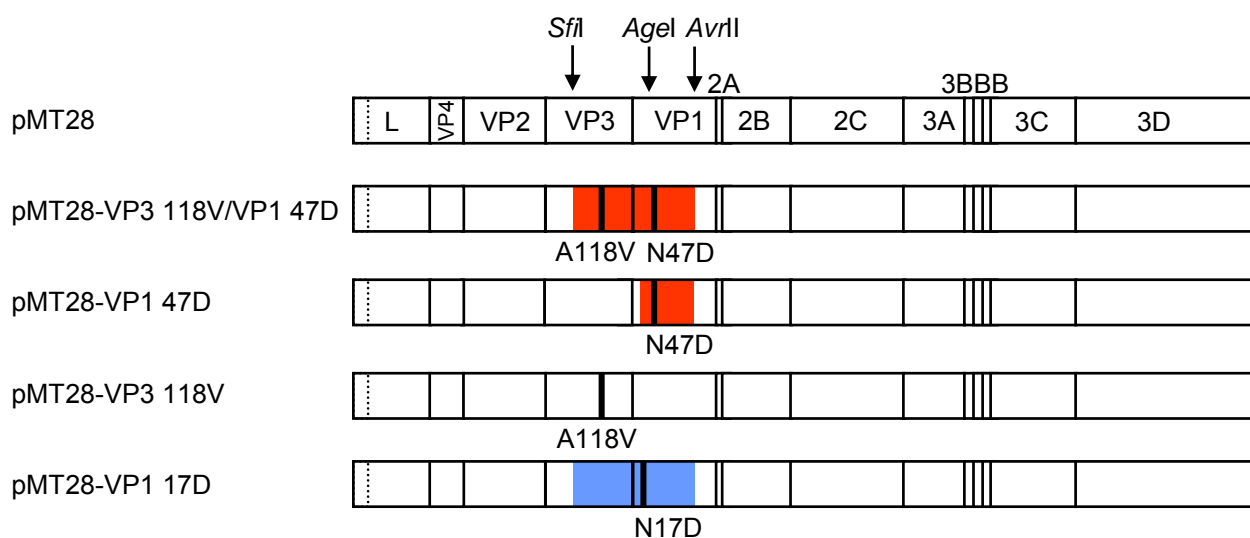


Fig. 8. Representación esquemática de la región codificante contenida en los clones infecciosos de VFA construidos. La posición de las dianas de las enzimas de restricción utilizadas en la construcción de los clones infecciosos se indica con flechas. En rojo se presenta el fragmento de cDNA procedente del virus c2 resistente a NH_4Cl , utilizado en la construcción de los clones infecciosos. En azul se presenta el fragmento del cDNA procedente del virus m6 resistente a pH ácido. Las barras negras indican la posición de los cambios de aminoácido con respecto al pMT28. Para una descripción detallada del proceso de construcción de los clones infecciosos, consultar el texto.

-pMT28-VP3 118V: El clon infeccioso pMT28-VP3 118V fue generado mediante mutagénesis dirigida por PCR utilizando el método de *overlap extension* (Sambrook y Russell, 2001). Para introducir el cambio C2903T en el clon infeccioso pMT28, que codifica la sustitución VP3 A118V, se realizaron dos reacciones independientes utilizando como molde el DNA del plásmido pMT28. En la primera se utilizó el cebador SB5 combinado con el cebador mut2903a que contiene el nucleótido mutado (ver Tabla IV). En la segunda reacción de PCR se combinó el oligonucleótido cebador mut2903s con el cebador 3946a. Los fragmentos de DNA resultantes de la amplificación fueron purificados; a continuación se mezclaron 50 ng de cada uno de ellos y se utilizaron como molde en una nueva amplificación por PCR empleando como

cebadores SB5 y 3946a. El fragmento de DNA amplificado por PCR del tamaño correspondiente fue purificado mediante electroforesis en gel de agarosa y digerido con las enzimas de restricción *Sfi*I y *Avr*II (New England Biolabs). El plásmido pMT28 fue digerido con las mismas enzimas, purificado de gel y ligado con el inserto (relación plásmido:inserto de 1:3) utilizando la ligasa de DNA del bacteriófago T4 (Promega) de acuerdo a las instrucciones de fabricante.

-pMT28-VP3 118V/VP1 47D: La región correspondiente del cDNA, obtenido mediante transcripción inversa a partir del RNA extraído del virus c2 (apartado 4.10), fue amplificada mediante PCR utilizando los cebadores SB5 y 3946a. El DNA amplificado fue purificado y digerido con las enzimas de restricción *Sfi*I y *Avr*II. Este inserto fue ligado (como en el apartado anterior) con el vector pMT28 digerido con las mismas enzimas.

-pMT28-VP1 47D: Este clon infeccioso se construyó mediante triple ligación de los siguientes fragmentos de DNA purificados mediante electroforesis en gel de agarosa:

i) Fragmento comprendido entre las dianas de corte *Sfi*I y *Age*I del clon infeccioso pMT28. ii) Fragmento comprendido entre las dianas *Age*I y *Avr*II del clon infeccioso pMT28-VP3 118V/VP1 47D, que contiene el cambio de nucleótido A3346G que codifica la sustitución N47D en la proteína VP1. iii) Vector pMT28 digerido con *Sfi*I y *Avr*II.

-pMT28-VP1 17D: La región correspondiente del cDNA, obtenido mediante transcripción inversa a partir del RNA extraído del virus m6 (apartado 4.11), fue amplificada mediante PCR utilizando los cebadores SB5 y 3946a. El DNA amplificado fue purificado y digerido con las enzimas de restricción *Sfi*I y *Avr*II. Este inserto fue ligado con el vector pMT28 digerido con las mismas enzimas.

Con el producto de las diferentes ligaciones se transformaron bacterias competentes *E. coli* DH5 α (Inoue et al., 1990), preparadas en el Servicio de Fermentación del CBM “Severo Ochoa”. Las bacterias fueron sembradas en placas de agar con medio LB (Luria y Burrous, 1957) suplementado con 100 μ g/ml de ampicilina (Boheringer Mangheim). Las colonias de bacterias capaces de crecer fueron inoculadas y propagadas en medio líquido (LB con 50 μ g/ml de ampicilina). Los plásmidos resultantes de la amplificación en *E. coli* fueron purificados con el Plasmid Maxi Kit (Quiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La secuencia nucleotídica de la región de los diferentes plásmidos que codifica las proteínas de la cápsida de VFA (P1) fue confirmada mediante secuenciación de DNA (apartado 4.13).

4.15 Transcripción *in vitro* de plásmidos

Se empleó como molde DNA de los diferentes clones infecciosos, descritos en el apartado 4.14, linearizado mediante digestión con la enzima de restricción *NdeI* (New England Biolabs). El RNA fue transcrito a partir de 100 ng del molde linearizado utilizando la RNA polimerasa del bacteriófago SP6 (New England Biolabs). El DNA molde fue eliminado por digestión con la nucleasa de DNA RQ1 libre de nucleasas de RNA (Promega). La cantidad y pureza del RNA sintetizado se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa, tinción con bromuro de etidio y espectrofotometría UV, utilizando un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Nanodrop).

4.16 Transfección de células eucarióticas con RNA viral

Las células BHK-21 subconfluentes (70% de confluencia) crecidas en placas de cultivo de tejido de 35 mm de diámetro fueron transfectadas con 0.5 µg de RNA utilizando Lipofectin Reagent (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El virus recuperado de la transfección (24 - 48 h post-transfección) fue amplificado infectando mediante dos pases en células BHK-21. La identidad de la región P1 del virus recuperado fue comprobada mediante extracción de RNA y secuenciación del mismo (apartado 4.13).

4.17 Inactivación de virus

La inactivación del VFA se realizó utilizando etilenimina binaria (BEI) (Bahnemann, 1975) que se preparó a partir de una disolución 0.01 M de 2-bromoetilamina hidrobromuro (BEA) (Merck) en 7% NaOH. Se añadieron 0.05 ml/l de 1% β-naftol a la disolución de BEA, que de esta manera, adquiere un color violeta. La disolución fue calentada a 37° C con agitación periódica, hasta observar un cambio de color de violeta a naranja, indicativo de la conversión de BEA a BEI. Una vez esterilizada por filtración (tamaño de poro del filtro: 0.22 µm), se añadió un 3% de esta disolución de BEI a la suspensión viral, incubándose con agitación durante 24 h a 37° C. Entre las 15 y 18 h del inicio de la incubación, la mezcla se cambió de recipiente para evitar que partículas de virus fuera de la suspensión contaminasen el antígeno inactivado. Una vez transcurridas 24 h, la BEI residual en la suspensión de virus se hidrolizó añadiendo un 2% de una disolución 1 M de tiosulfato de sodio (Na₂SO₃). La eficacia de la inactivación se verificó mediante inoculación en medio líquido de monocapas de células BHK-21 y tres pases ciegos posteriores, comprobando la total ausencia de efecto citopático.

4.18 Marcaje y purificación de viriones

Para el marcaje con ^{35}S , se infectaron 4 botellas de 175 cm² (Nunc) de células BHK-21 con una m.d.i. > 1, de acuerdo a lo indicado en el apartado 4.4.1. A las 3 h p.i. se retiró el medio y se incubaron las células 1 h en DMEM sin Met ni Cys + 5% SFB. A continuación, se añadió la mezcla de L-(^{35}S) Met/Cys (Redivue Pro-mix, Amersham). La infección prosiguió hasta observarse efecto citopático completo y los sobrenadantes se recogieron y almacenaron a -70° C. Para la purificación de viriones inactivados se partió de los sobrenadantes procedentes de la infección en medio líquido de 20 botellas de células BHK-21, inactivados con BEI (apartado 4.17).

La purificación de los viriones se realizó empleando el método descrito por Diez et al. 1990. El sobrenadante de la infección fue centrifugado 10 min a 690 × g y, a continuación, 20 min a 9000 r.p.m. en un rotor SS34 (9700 × g) y una centrífuga Sorvall RC-5 (Du Pont Instruments). Los viriones fueron parcialmente purificados mediante ultracentrifugación en un colchón de sacarosa al 20% en TNE durante 2.5 h en un rotor AH627 a 25000 r.p.m. (112400 × g) utilizando una ultracentrífuga Optima L-100 XP (Beckman Coulter). El sedimento resultante fue resuspendido en TNE, cargado en un gradiente lineal (12 ml) del 7.5 al 30% de sacarosa en TNE y centrifugado durante 1 h a 37000 r.p.m. en un rotor SW40 (242800 × g). Se recogieron fracciones de 0.5 ml y el contenido de viriones fue determinado midiendo la actividad en cada alícuota mediante un contador de centelleo. Las fracciones que contenían viriones (coeficiente de sedimentación 140 S) fueron juntadas y sometidas a diálisis extensiva frente a PBS (utilizando membranas Dialysis Tubing-Visking, MWCO 12-14000 Da; Medicell International) para eliminar los restos de sacarosa. Tras la diálisis, los viriones marcados radiactivamente fueron cargados en un gradiente lineal de sacarosa del 7.5 al 45% y centrifugados en el rotor SW40 a 18000 r.p.m. durante 18 h (57500 × g). De nuevo, se recogieron alícuotas de 0.5 ml y la actividad fue determinada en cada una mediante contaje de centelleo.

4.19 Bloqueo con péptidos sintéticos de la adsorción de VFA

El bloqueo con péptidos de la adsorción de VFA se realizó siguiendo una modificación del ensayo descrito por Mateu et al. (1996). Para ello se emplearon monocapas de células BHK-21 crecidas sobre cubreobjetos que se lavaron dos veces con PBS suplementado con Ca²⁺ y Mg²⁺ y se incubaron durante 30 min a 37° C con un péptido sintético que abarca las posiciones 139 a 153 de VP1 de VFA C-S8c1 (SARGDLAHLTTTHAR); éste péptido contiene la secuencia RGD de interacción con las integrinas celulares. Como control se utilizó un péptido no-RGD con la secuencia de las posiciones 104 a 118 de VP1 del aislado C-S8c1 (PTAYHKGPVTRLALP). Los

péptidos fueron sintetizados por D. Aadreu (Universidad Pompeu Fabra) y se diluyeron en PBS (con Ca^{2+} y Mg^{2+}) a una concentración final de 1 mM. Tras un lavado con PBS, las células se incubaron 25 min a 37° C con VFA (m.d.i. 100) diluido en PBS completo. Tras dos lavados con PBS completo, las células se fijaron y procesaron para inmunofluorescencia como se describe en el apartado 4.7.2.

4.20 Neutralización con anticuerpos monoclonales

El virus a neutralizar se mezcló con un 10% de sobrenadante de cultivo celular de hibridoma y se incubó durante 30 min a t.a. A continuación, se inocularon con la mezcla las monocapas de células BHK-21 crecidas sobre cubreobjetos colocados en placas de 24 pocillos. Tras 25 min a 37° C, las células fueron fijadas y procesadas para inmunofluorescencia como se describe en el apartado 4.7.2.

4.21 Métodos estadísticos y análisis de los datos

Los valores representados en las gráficas corresponden a la media de los datos \pm el valor de la desviación estándar de la muestra. Los datos fueron sometidos a análisis de la varianza (ANOVA) usando la distribución *F* de Fisher-Snedecor y aplicando la corrección de Bonferroni al test de la *t* de Student en el caso de las comparaciones múltiples. Para ello se empleó el programa informático SPSS versión 15 (SPSS). Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando el *p*-valor calculado fue menor de 0.05 y se indican mediante un asterisco (*) en las gráficas, o dos asteriscos (**) en el caso de $p < 0.005$.

4.22 Disoluciones y tampones

-Tripsina-EDTA: 0.5 mg/ml tripsina (Difco), 0.016% EDTA, 0.0015% rojo fenol, 1.12 mM glucosa, disueltos en PBS.

-Tampón TAE: 40 mM Tris-acetato sódico pH 8.0, 1 mM EDTA.

-Tampón fosfato pH 6: 12 mM HNa_2PO_4 , 88 mM H_2NaPO_4 .

-Tampón electroforesis de proteínas: 192 mM glicina, 25 mM Tris, 0.1% SDS.

-Tampón transferencia de proteínas: 25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% metanol.

-PBS: 1.5 mM KH_2PO_4 , 8.1 mM Na_2HPO_4 , 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl.

-Tampón TNE: 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM EDTA, 100 mM NaCl.

Salvo que se indique lo contrario, todos los reactivos utilizados en la preparación de disoluciones y tampones fueron obtenidos de Merck.

Resultados

5. Resultados

5.1 Caracterización de la ruta de entrada del VFA en cultivos celulares

5.1.1 El tratamiento con medio hipertónico inhibe la infección de VFA

El tratamiento con medio hipertónico (conteniendo 0.45 M sacarosa) produce una reducción en el número de fosetas revestidas de clatrina (Heuser y Anderson, 1989) e inhibe la internalización de virus que utilizan esta ruta, incluyendo VFA de serotipo O en células humanas establemente transfectadas con la integrina $\alpha_v\beta_6$ (Berryman et al., 2005; Kee et al., 2004).

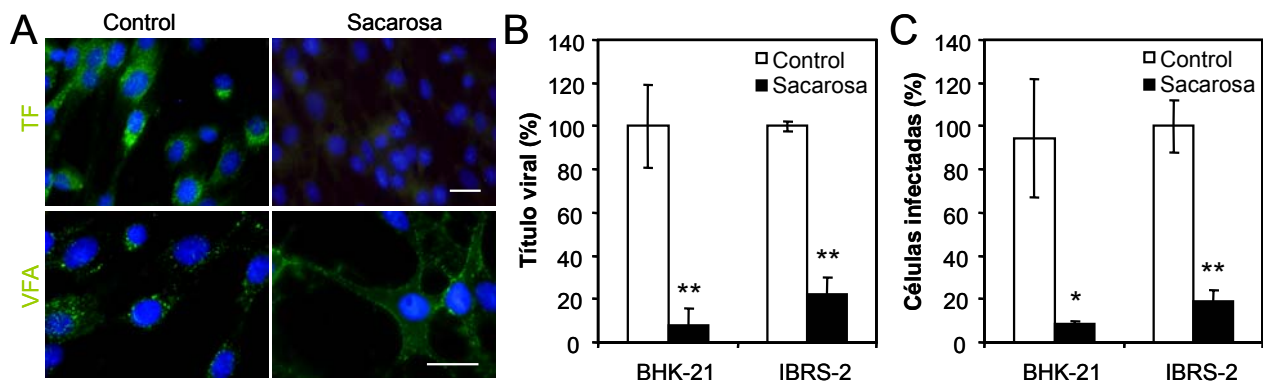


Fig. 9. El medio hipertónico inhibe la entrada e infección de VFA.

A) Efecto del medio hipertónico (sacarosa 0.45 M) sobre la internalización de TF y VFA. Las células, tratadas o no, con sacarosa fueron incubadas con TF AF488 (verde) durante 5 min y sometidas a lavado ácido (para eliminar la TF extracelular), o con VFA (25 min) y procesadas para inmunofluorescencia con el AcM 5C4 y un Ac secundario acoplado a AF488 (verde). En azul, la tinción de los núcleo con DAPI. Barras: 20 μ m.

B) Efectos del medio hipertónico sobre el título de VFA. Las células tratadas con sacarosa, como se describe en el apartado 4.5, fueron infectadas con VFA (m.d.i. de 0.5). Los viriones extracelulares se inactivaron con un lavado ácido tras la primera hora de infección y el título viral se determinó 8 h p.i.

C) Efectos del medio hipertónico sobre el número de células infectadas con VFA. Las células se trataron con sacarosa y se infectaron con el VFA (m.d.i. de 0.5). El número de células infectadas fue determinado mediante inmunofluorescencia utilizando el AcM SD6 y un Ac secundario acoplado a AF488.

Las células BHK-21 (Fig. 9A) e IBRS-2 (datos no mostrados) tratadas con sacarosa mostraron una reducción en la internalización de TF, ligando modelo que utiliza la ruta dependiente de clatrina (Hanover et al., 1984; Miller et al., 1991). También se observó una reducción en la internalización de partículas de VFA, mediante inmunofluorescencia con el AcM 5C4. Las células control presentaron un patrón de fluorescencia punteado y citoplasmático, correspondiente a las partículas virales internalizadas. Contrariamente, en células tratadas con sacarosa, la fluorescencia correspondiente a las partículas virales se observó en la periferia

Resultados

celular. Este hecho es indicativo de una reducción de la internalización de partículas virales, pero no de su adsorción. Por otra parte, el tratamiento con sacarosa causó una reducción significativa tanto del título viral total alcanzado por VFA (Fig. 9B), como del porcentaje de células infectadas detectadas mediante inmunofluorescencia (Fig. 9C). Estos resultados son consistentes con el requerimiento de clatrina para la infección de VFA.

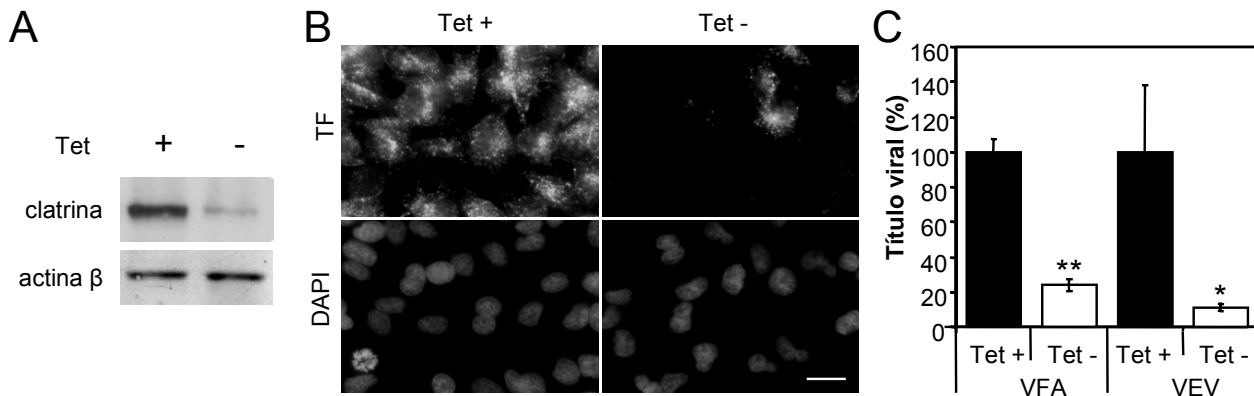


Fig. 10. La expresión de un RNA antisentido frente a la cadena pesada de la clatrina inhibe la infección de VFA y VEV.

A) Reducción en la cantidad de cadena pesada de clatrina. Las células BHKasc fueron crecidas durante 72 h en medio Tet+ (control) o medio Tet- (expresión del RNA antisentido), a continuación fueron lisadas y procesadas para *western blot*, utilizando un Ac frente a la cadena pesada de la clatrina o un Ac anti-actina β como control de carga.

B) La expresión del RNA antisentido frente a la clatrina inhibe la internalización de TF. Las células BHKasc fueron incubadas durante 5 min con TF acoplada a AF488 (verde), sometidas a lavado ácido para eliminar la TF extracelular, fijadas y observadas mediante microscopía de fluorescencia. Barra: 20 μ m.

C) La expresión del RNA antisentido frente a la clatrina reduce la infección por VFA y VEV. Las células fueron infectadas con VFA o VEV (m.d.i. de 0.5). Los viriones extracelulares de VFA se inactivaron con un lavado ácido tras la primera hora de infección. A las 9 h p.i. el título viral fue determinado sobre células BHK-21.

5.1.2 La expresión de la cadena pesada de la clatrina es necesaria para la infección de VFA y VEV

El papel funcional de la clatrina en la internalización de VFA fue analizado mediante la utilización de la línea celular BHKasc (apartado 4.1), susceptible a la infección por VFA y VEV, este último es uno de los virus modelo cuya entrada mediada por clatrina está bien caracterizada (Johannsdottir et al., 2009; Pelkmans et al., 2005; Sun et al., 2005). Esta línea celular está establemente transfectada con un RNA antisentido frente a la cadena pesada de la clatrina, cuya transcripción está regulada por un represor inducido por tetraciclina (Tet) (Iversen et al., 2003). De esta manera, la retirada de la tetraciclina del medio de cultivo (Tet -) resultó en una reducción

de un 70% en la cantidad de cadena pesada de la clatrina detectada mediante *western blot* (Fig. 10A). La reducción de la cadena pesada de la clatrina originó un descenso del 90% en el número de células capaces de internalizar TF (Fig. 10B), confirmado que la expresión del RNA antisentido inhibe la endocitosis. La expresión del RNA antisentido frente a la clatrina (Tet -) originó una bajada del 80% de la producción viral de VFA y VEV, con respecto al control (Tet +) (Fig. 10C). Estos resultados confirman el papel funcional de la clatrina en la internalización y establecimiento de una infección productiva de VFA y VEV.

5.1.3 El progreso de la infección de VFA depende de la acidificación endosomal

Los ligandos internalizados mediante la ruta dependiente de clatrina son transportados a compartimentos endosomales caracterizados por tener pH ácido (6.5 - 5.0) en su interior (apartado 2.2.1). Para determinar el requerimiento de tráfico a través de un compartimento de pH ácido en el ciclo de infección de VFA, las células BHK-21 (Fig. 11) e IBRS-2 (apartado 5.5.2) fueron tratadas con NH_4Cl . Este compuesto bloquea la acidificación de los compartimentos endosomales e impide la penetración de virus dependientes de pH ácido (Baxt, 1987; Helenius et al., 1982; Ohkuma y Poole, 1978).

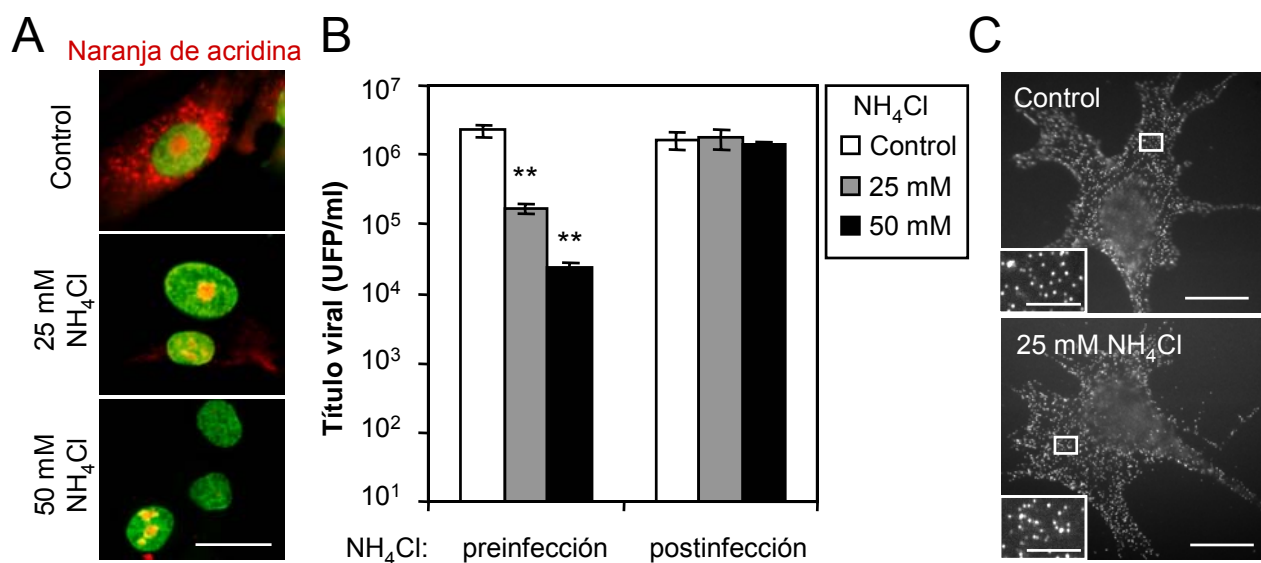


Fig. 11. El bloqueo de la acidificación endosomal con NH_4Cl inhibe la infección de VFA en células BHK-21.

A) Reducción del contenido de orgánulos ácidos (rojo) en las células tratadas con NH_4Cl , estimada mediante tinción vital con NA. Los núcleos de las células teñidos con el NA se observan en verde. Barra: 20 μm .

B) El NH_4Cl reduce la infección de VFA. Las células tratadas como se describe en Materiales y Métodos (apartado 4.5) fueron infectadas con C-S8c1 (m.d.i. de 0.5) y el título viral fue determinado 8 h p.i.

C) El NH_4Cl no inhibe la adsorción e internalización de VFA. Las células control o tratadas con NH_4Cl fueron incubadas con C-S8c1 (m.d.i. de 100) durante 25 min a 37° C. Posteriormente fueron fijadas y procesadas para inmunofluorescencia utilizando el AcM 5C4 y un Ac secundario acoplado a AF488. Barras: 20 μm y 5 μm (detalle).

Resultados

Las células BHK-21 teñidas con NA mostraron un patrón vesicular de fluorescencia roja correspondiente a la acumulación de este fluorocromo dentro de orgánulos ácidos (Fig. 11A). Por el contrario, estas células tratadas con NH_4Cl mostraron una reducción en el contenido de orgánulos ácidos, confirmando el aumento de pH endosomal inducido por NH_4Cl . Cuando los cultivos de células BHK-21 tratados con NH_4Cl fueron infectados con VFA, se observó una reducción significativa del título viral alcanzado (Fig. 11B), siendo mayor en las células tratadas con 50 mM NH_4Cl , que en las tratadas con 25 mM NH_4Cl . Sin embargo, cuando el NH_4Cl se añadió p.i., no se observó una reducción del título viral, confirmando que este compuesto afecta una etapa temprana de la infección.

Para evaluar los posibles efectos del NH_4Cl sobre la adsorción e internalización de VFA, células BHK-21 fueron tratadas con NH_4Cl , incubadas con el virus y fijadas tras 25 min a 37° C, tiempo suficiente para que se produzca la internalización de los viriones (Fig. 11C). El patrón punteado observado mediante inmunofluorescencia confirmó la presencia de partículas virales tanto en las células control como en las tratadas con NH_4Cl , indicando que este compuesto no inhibe ni la adsorción, ni la internalización de VFA. Un experimento análogo se llevó a cabo a las 4 h p.i., tiempo suficiente para que comience la síntesis de proteínas no estructurales. En este caso se realizó un doble marcaje con el AcM 5C4 y un AcP frente a la proteína no estructural 3A. Las células control mostraron un patrón de distribución perinuclear de la proteína 3A, característico del complejo de replicación (apartado 2.4.1.5). La fluorescencia frente al AcM 5C4 se encontró dispersa por todo el citoplasma de la célula, como resultado de la síntesis *de novo* de proteínas de la cápsida (Fig. 12A). Las células tratadas con NH_4Cl fueron negativas para 3A, indicando que la síntesis de proteínas no estructurales no había tenido lugar. El AcM 5C4 reveló un patrón de distribución punteado, comparable el encontrado en etapas tempranas de la infección. Estos resultados sugieren que las partículas de VFA internalizadas en las células tratadas con NH_4Cl quedan retenidas en compartimientos endosomales. Para confirmar la naturaleza de los compartimientos donde se retienen las partículas virales, se realizó un doble marcaje con el AcM 5C4 y un AcP frente a la proteína EEA1, que marca endosomas tempranos. Ambos marcadores colocalizaron en las células tratadas con NH_4Cl (Fig. 12B), confirmando que el VFA internalizado queda retenido en endosomas tempranos.

Por otro lado, el tratamiento con Con A, un inhibidor específico de la V-ATPasa, que bloquea la acidificación de los compartimientos endosomales, produjo una bajada significativa de la infección de VFA tanto en células BHK-21, como IBRS-2 (Fig. 13), siendo la infección de estas últimas más sensible al tratamiento con Con A. Estos resultados confirman el requerimiento de endosomas ácidos para la infección productiva de VFA.

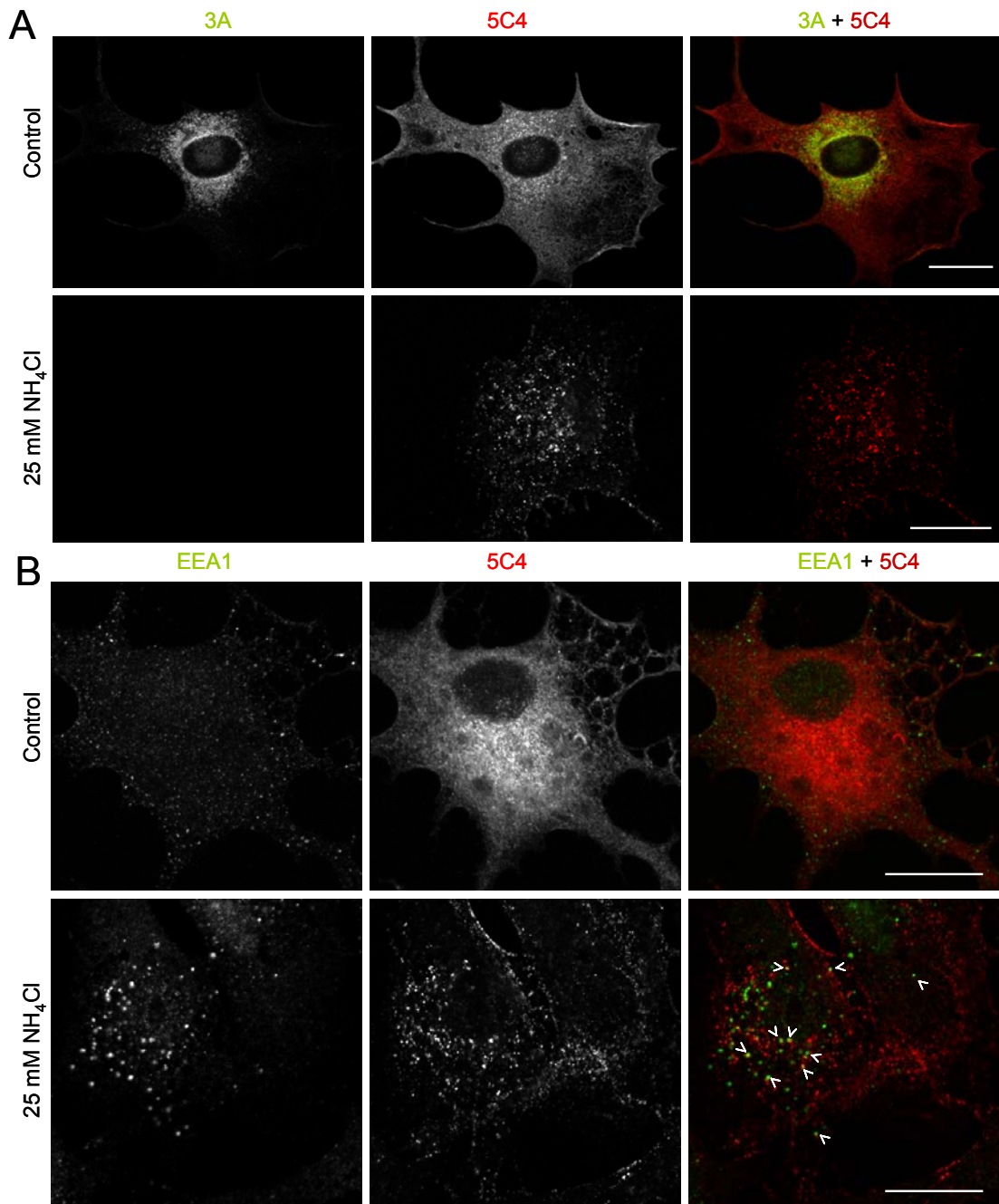


Fig. 12. Las partículas de VFA internalizadas en células BHK-21 tratadas con NH_4Cl quedan retenidas en endosomas.

A) El NH_4Cl inhibe la síntesis de proteínas no estructurales. Las células BHK-21 tratadas con NH_4Cl fueron incubadas con C-S8c1 (m.d.i. de 100), fijadas 4 h p.i. y procesadas para inmunofluorescencia y microscopía confocal utilizando el AcP 163 anti-3A y el AcM 5C4. Los Ac secundarios utilizados fueron anti-conejo acoplado a AF488 (verde) y anti-ratón acoplado a AF555 (rojo). Barra: 20 μm .

B) Las partículas de VFA internalizadas en células tratadas con NH_4Cl quedan retenidas en endosomas tempranos. Se emplearon células tratadas e infectadas como en (A) que fueron fijadas 4 h p.i. y procesadas para inmunofluorescencia usando el AcM 5C4 y un AcP anti-EEA1. Los Ac secundarios utilizados fueron anti-conejo acoplado a AF488 (verde) y anti-ratón acoplado a AF555 (rojo). Las puntas de flecha indican colocación entre ambos marcadores (amarillo). Barra: 20 μm .

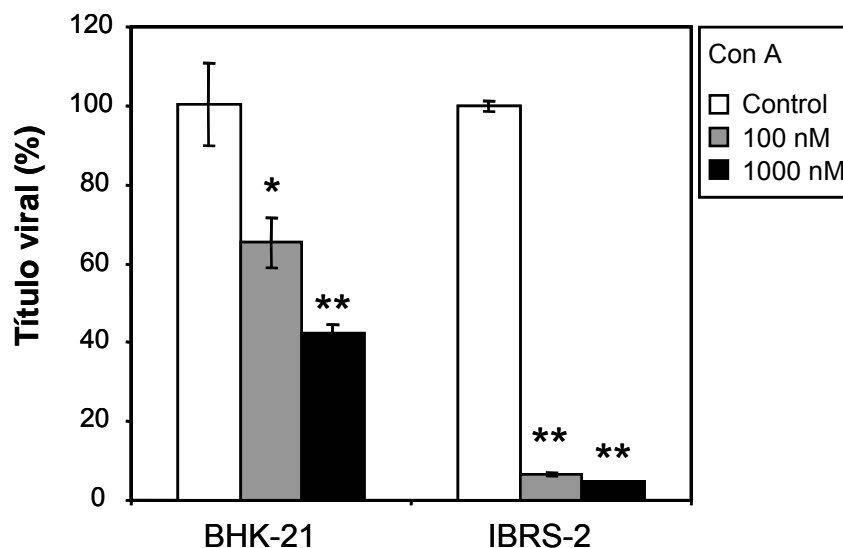


Fig. 13. Efecto del tratamiento con Con A sobre la infección de VFA.

Las células BHK-21 e IBRS-2 fueron tratadas con diferentes concentraciones de Con A e infectadas con VFA C-S8c1 (m.d.i. de 0.5) como se describe en el apartado 4.5. El título viral (8 h p.i.) fue determinado empleando células BHK-21.

5.2 Aislamiento y caracterización de mutantes de VFA resistentes a NH_4Cl

5.2.1 Aislamiento de mutantes de VFA resistentes a NH_4Cl

Siguiendo la estrategia descrita en el apartado 4.10, se realizó una infección de células BHK-21 con el virus C-S8c1, añadiéndose, tras la primera hora, medio semisólido que contenía 25 mM NH_4Cl . Transcurridas 30 h de infección en este medio semisólido, las monocapas tratadas con NH_4Cl mostraron aproximadamente un $8 \pm 2\%$ de las placas de lisis observadas en placas control (frecuencia de selección 8×10^{-2}) (Fig. 14). Tres de estas placas virales capaces de crecer en presencia de NH_4Cl , denominadas c1, c2, y c3, se picaron y fueron amplificadas mediante dos pases seriados en células BHK-21, manteniendo el NH_4Cl en el medio de cultivo. Los virus utilizados en todos los experimentos que se indican a continuación corresponden al segundo pase.

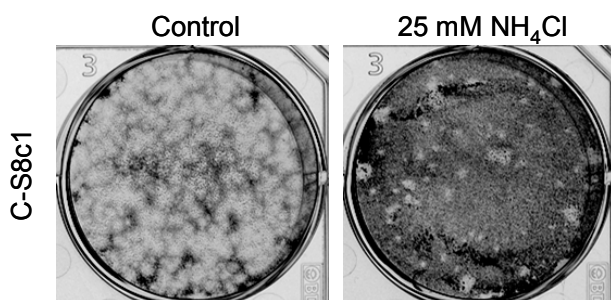


Fig. 14. Placas de lisis obtenidas en presencia de NH_4Cl .

Las células BHK-21 fueron infectadas con la misma cantidad de C-S8c1 en medio semisólido conteniendo o no (control) 25 mM NH_4Cl . Las células fueron fijadas y teñidas con cristal violeta 30 h p.i.

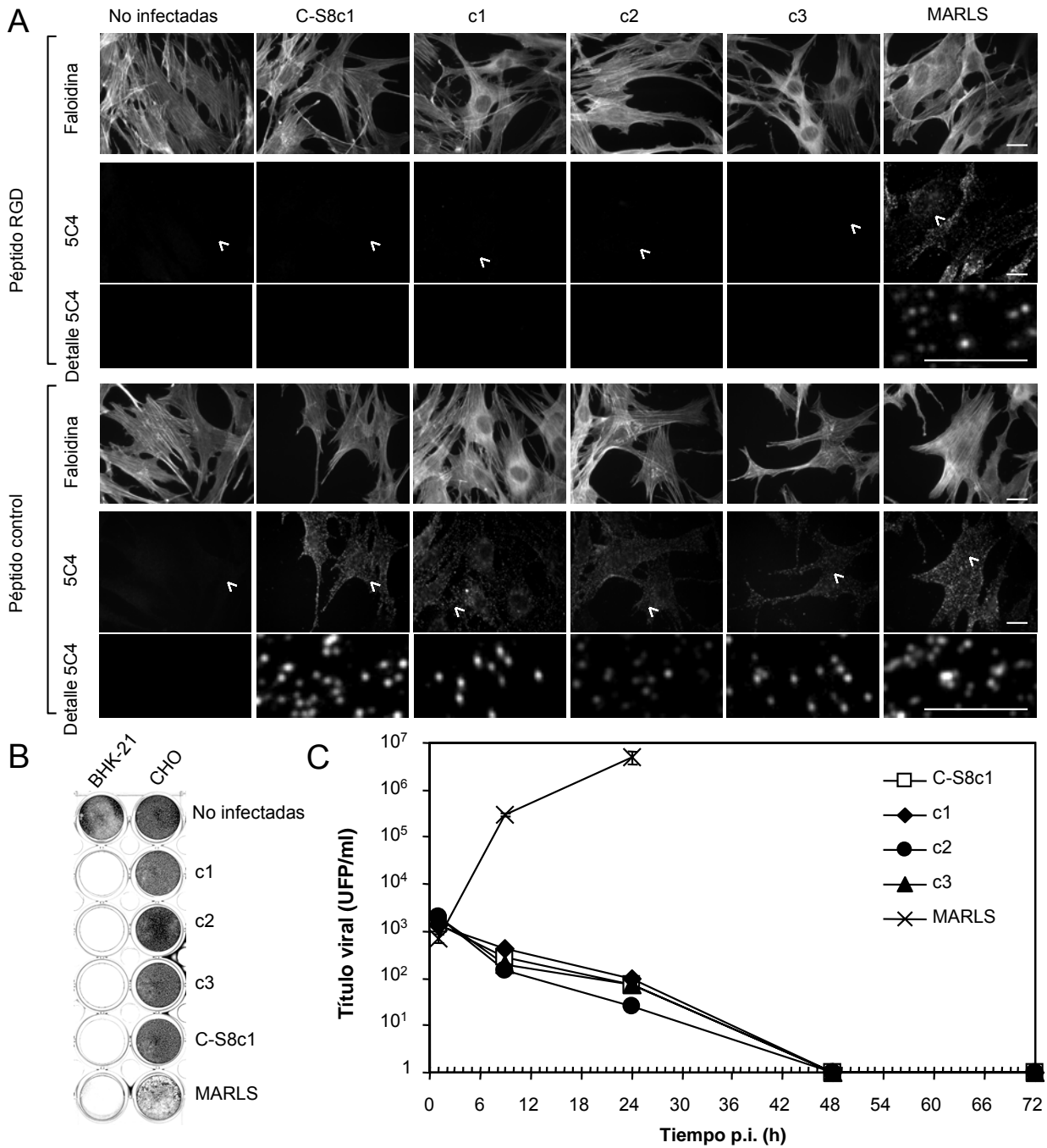


Fig. 15. Los mutantes resistentes a NH_4Cl utilizan integrinas como receptor celular.

A) Bloqueo de la adsorción de VFAs con un péptido RGD. Las células BHK-21 fueron preincubadas con un péptido que contiene la secuencia RGD de interacción con la integrina celular, o con un péptido control, e incubadas 25 min con los diferentes virus (m.d.i. de 100), fijadas y procesadas para inmunofluorescencia usando el AcM 5C4 y un Ac secundario acoplado a AF555. La tinción de la F-actina con faloidina revela la forma de las células. Las puntas de flecha señalan la región ampliada en los detalles. Barras: 20 μm y 5 μm en los detalles.

B) Los virus resistentes a NH_4Cl no inducen efecto citopático en células CHO. Las células CHO y BHK-21 fueron infectadas con los diferentes virus (m.d.i. de 0.5), 40 h p.i. las células fueron fijadas y teñidas con cristal violeta.

C) Los virus resistentes a NH_4Cl no crecen en las células CHO. Las células CHO fueron infectadas como en (B) y a los diferentes tiempos p.i. indicados, el título viral en el sobrenadante fue determinado mediante titulación en células BHK-21.

5.2.2 Los mutantes de VFA resistentes a NH₄Cl utilizan integrinas como receptor

En primer lugar, se estudió la capacidad de los clones biológicos de VFA (c1, c2 y c3) de utilizar integrinas como receptor celular. Para ello, se realizaron ensayos de bloqueo utilizando un péptido sintético de la proteína VP1 que contiene la secuencia RGD de interacción con integrinas celulares y, como control, un péptido de otra región de VP1 que no contiene el motivo RGD. Las células tratadas con los péptidos fueron incubadas a continuación con los virus resistentes a NH₄Cl, la población de C-S8c1 de la que fueron aislados y el virus MARLS, un derivado de C-S8c1 capaz de utilizar otros receptores celulares diferentes a las integrinas (Baranowski et al., 2000; Baranowski et al., 1998). Tras 25 min de incubación con los virus, las células fueron fijadas y procesadas para inmunofluorescencia (Fig. 15A). En las células tratadas con el péptido RGD no se detectó fluorescencia frente a ninguno de los virus excepto MARLS, mientras que en las células tratadas con el péptido control se observó, en todos los casos, fluorescencia correspondiente a proteínas de la cápsida. Estos resultados indican que los mutantes resistentes a NH₄Cl necesitan el motivo RGD para infectar células BHK-21. A continuación, se inocularon monocapas de células CHO, que no expresan las integrinas utilizadas como receptor por el VFA (Gutierrez-Rivas et al., 2008) (Fig. 15B). Mientras que todos los virus analizados fueron capaces de inducir efecto citopático en monocapas de células BHK-21, sólo MARLS causó efecto citopático en las células CHO. Analizando el título viral en el sobrenadante de cultivos de células CHO infectadas con estos virus, se comprobó que MARLS era el único capaz de crecer en ellas (Fig. 15C). Estos resultados indican, que al igual que el aislado C-S8c1, los mutantes resistentes a NH₄Cl utilizan integrinas como receptor celular. Esto implica que la capacidad de crecimiento en presencia de NH₄Cl de los virus c1, c2 y c3 no se debe a un cambio en el receptor celular utilizado.

5.2.3 Análisis de las mutaciones en la cápsida seleccionadas en los virus resistentes a NH₄Cl

La región del RNA viral que codifica las proteínas de la cápsida (P1) fue íntegramente secuenciada en los virus resistentes a NH₄Cl (c1, c2 y c3) y en el preparado de C-S8c1 empleado para su selección (Tabla V). Las mismas sustituciones de nucleótidos se encontraron en los dos pases sucesivos dados a los virus resistentes a NH₄Cl. La región de la cápsida del mutante c1 presentó dos sustituciones sinónimas, en nucleótidos correspondientes a las secuencias de VP2 y VP3. Además, el mutante c1 presentó una sustitución no sinónima responsable del cambio de aminoácido VP3 A123T. El mutante c2 presentó dos sustituciones no sinónimas responsables de los cambios VP3 A118V y VP1 N47D. El mutante c3 también presentó dos sustituciones no sinónimas que originan los cambios VP2 D106G y VP1 H151R. Sólo una de las mutaciones en

cada uno de los virus resistentes a NH_4Cl (c1, VP3 A123T; c2, VP3 A118V; c3, VP2 D106G) se localizó en una posición descrita como invariante en la cápsida de aislados de los 7 serotipos de VFA (Carrillo et al., 2005). Todas las mutaciones fueron estables tras seis pases seriados en ausencia de NH_4Cl (datos no mostrados).

Tabla V. Sustituciones de nucleótido seleccionadas en clones de VFA resistentes a NH_4Cl ^a

Región genómica	Virus		
	c1	c2	c3
VP4			
VP2	C2082T		A2213G D106G^b
VP3	G2917A A123T^b C3117T	C2903T A118V^b	
VP1		A3346G N47D	A3659G H151R

^a Se muestran las mutaciones encontradas respecto de la secuencia determinada para el preparado de C-S8c1 utilizado, que mostró la sustitución silenciosa de nucleótido T3117C, respecto a la publicada por Toja et al. (1999). Los cambios de aminoácido se indican en negrita.

^b Descrita como una posición invariante en la cápsida entre aislados de VFA (Carrillo et al., 2005).

5.2.4 Localización espacial de las mutaciones seleccionadas en presencia de NH_4Cl en la cápsida viral

La estructura de la cápsida del aislado de VFA C-S8c1 ha sido resuelta mediante cristalografía de rayos X (Lea et al., 1994), lo que ha permitido la localización espacial de los residuos de aminoácido implicados en las mutaciones encontradas (Fig. 16). Los tres cambios encontrados en posiciones invariantes (c1, VP3 A123T; c2, VP3 A118V; c3, VP2 D106G) se localizaron en láminas β : A123T y A118V en la lámina β -E de VP3, y D106G en la lámina β -D de VP2 (Lea et al., 1994) (Fig. 16A).

La localización en las subunidades pentaméricas de la cápsida de los residuos implicados en las distintas mutaciones encontradas se muestra en la Fig. 16B. La mutación VP3 A123T, que fue encontrada en el mutante c1, se localizó cerca del borde del pentámero, muy próxima a la mutación VP3 A118V encontrada en el mutante c2. El otro cambio de aminoácido del mutante c2, VP1 N47D, se localizó en una posición expuesta de la cápsida, dentro de una región que se ha descrito que está sometida a selección positiva (Martín et al., 1998). En el mutante c3, la sustitución VP2 D106G se localizó en una región interna de la cápsida, mientras que el cambio VP1 H151R se situó en la superficie de la cápsida, al final del bucle G-H, yuxtapuesto al sitio antigénico A (posiciones 130-150) (Lea et al., 1994; Mateu et al., 1990).

Las sustituciones de aminoácido VP3 A118V y VP3 A123T se sitúan cerca del borde interpentamérico (Fig. 16C) y suponen la introducción de residuos más voluminosos, lo que podría generar perturbaciones estructurales. Ambas mutaciones, se localizan muy cerca de los

Resultados

residuos VP3 H140 y VP3 H143, para las que se ha descrito su implicación en el desensamblaje de las cápsidas de VFA (apartado 2.4.1.4.1).

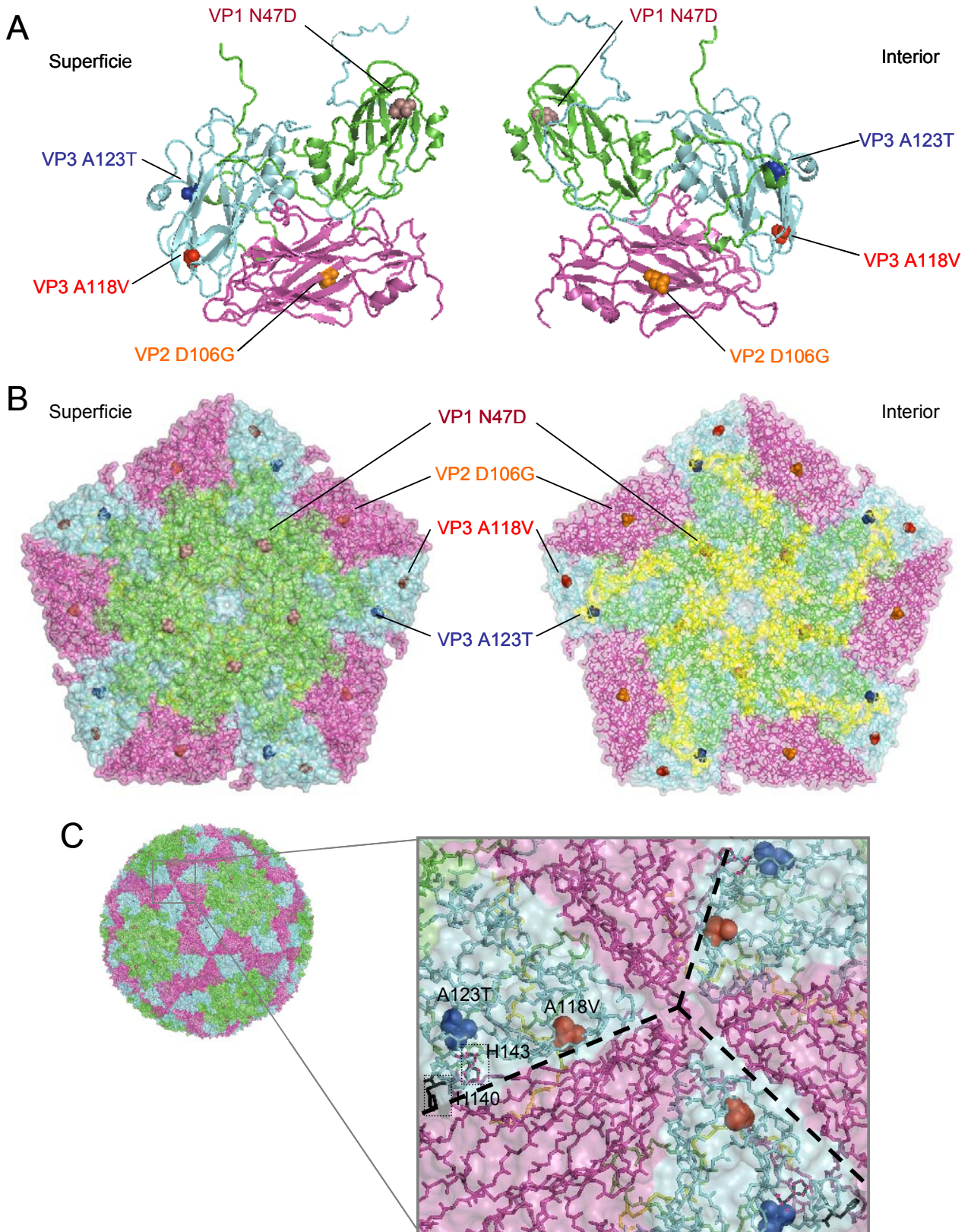


Fig. 16. Localización espacial de los residuos mutados en la cápsida de los virus resistentes a NH_4Cl . Ver leyenda en la página siguiente.

Fig. 16. Localización espacial en la cápsida del virus C-S8c1 de las sustituciones de aminoácido encontradas en los mutantes resistentes a NH_4Cl .

La posición VP1 H151 no se indica en el diagrama ya que está localizada en el bucle móvil G-H, cuya estructura no está determinada, debido a su flexibilidad, en el modelo de la cápsida de C-S8c1 (Lea et al., 1994).

A) Vistas de la superficie externa y la cara interna del protómero biológico de C-S8c1. La proteína VP4 no se muestra por simplificación.

B) Vista de la superficie externa y la cara interna de la subunidad pentamérica de la cápsida.

C) Detalle de un eje de simetría de orden 3 mostrando el contacto entre tres pentámeros vecinos en el que se indican las posiciones VP3 A118 y VP3 A123. Los residuos VP3 H140 y VP3 H143 de también han sido señalados. Las líneas discontinuas indican el borde de los diferentes pentámeros.

Código de colores: VP1 en verde; VP2 en magenta, VP3 en cian y VP4 en amarillo.

5.2.5 La resistencia a NH_4Cl está relacionada con el incremento de la sensibilidad a pH ácido de las partículas en los mutantes de VFA

Con objeto de analizar la sensibilidad a NH_4Cl de los mutantes c1, c2 y c3 se llevaron a cabo infecciones con estos mutantes en presencia de 25 mM NH_4Cl . Como se muestra en la Fig. 17A, el crecimiento de los mutantes c1, c2 y c3 en las células BHK-21 se vio inhibido en menor medida que el de C-S8c1, confirmando su fenotipo resistente. Estos experimentos revelaron una sensibilidad diferencial a NH_4Cl , siendo el mutante c2 el único capaz de alcanzar el mismo título tanto en presencia como en ausencia de NH_4Cl . El mutante c3 fue más resistente al tratamiento con NH_4Cl que el mutante c1.

A continuación, se examinó la sensibilidad a pH ácido de los diferentes virus, mediante ensayos de infectividad (apartado 4.12). Estos experimentos mostraron de nuevo un comportamiento diferencial entre los tres mutantes (Fig. 17B), siendo el mutante c2 el más sensible al tratamiento con pH ácido, con un valor de pH_{50} (definido como el valor de pH que ocasiona una bajada del 50% en la infectividad) de 6.95. Los mutantes c1 y c3 mostraron comportamientos intermedios (pH_{50} 6.70 para c1 y 6.78 para c3) entre el mutante c2 y C-S8c1 (pH_{50} de 6.58). Como control de estos experimentos se incluyó un enterovirus bovino (EVB), para el que no se observó ninguna bajada de infectividad dentro del rango de pH analizado. Estos resultados indican que la resistencia a la inhibición de la acidificación endosomal debida al tratamiento con NH_4Cl se asocia con un incremento en la sensibilidad a pH ácido de las partículas de VFA mutantes.

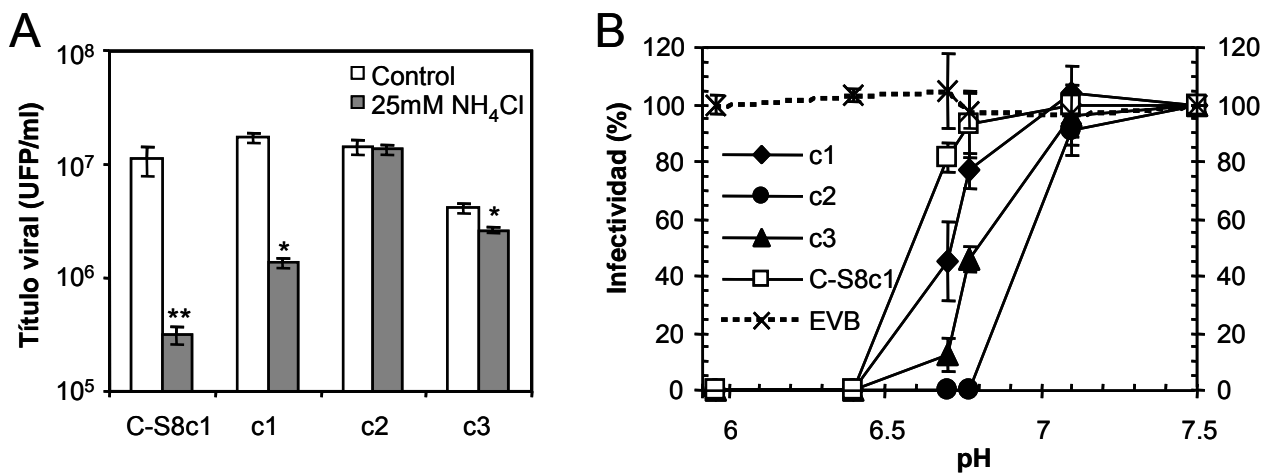


Fig. 17. Correlación entre la resistencia a NH₄Cl y el incremento en la sensibilidad a pH ácido de las partículas de VFA

A) Sensibilidad diferencial de los VFAs mutantes al tratamiento con NH₄Cl. Las monocapas de células BHK-21, tratadas o no con NH₄Cl, fueron infectadas (m.d.i. de 0.5) con los mutantes resistentes a NH₄Cl (c1, c2 y c3) y el virus C-S8c1. El título viral se determinó 8 h p.i.

B) Incremento de la sensibilidad a pH ácido en los mutantes de VFA resistentes a NH₄Cl. Las mismas UFP de cada uno de los virus fueron tratadas con tampones de diferentes pH y a continuación neutralizadas. La infectividad recuperada fue determinada mediante titulación en células BHK-21, y se expresa como porcentaje sobre la obtenida con un tampón pH 7.5.

5.2.6 Confirmación de la resistencia a NH₄Cl del mutante c2

El mutante c2 fue el único cuya infección produjo el mismo título viral en presencia y en ausencia de NH₄Cl (Fig. 17A). La resistencia a NH₄Cl de este virus fue confirmada en experimentos de conteo de células positivas para la proteína no estructural 3A, como marcador de infección productiva (Fig. 18A). No se observó reducción en el número de células positivas para 3A en el caso de la infección con el virus c2, mientras que el tratamiento con NH₄Cl redujo significativamente el número de células positivas para C-S8c1. Asimismo, se analizó la síntesis de proteínas virales en las células infectadas tratadas o no con NH₄Cl, mediante *western blot* (Fig. 18B). Las células tratadas con concentraciones crecientes de NH₄Cl e infectadas con C-S8c1 mostraron una reducción en la acumulación de la proteína VP1, que no fue observada en células infectadas con el mutante c2. La resistencia del mutante c2 a la inhibición de la acidificación endosomal fue también examinada en células IBRS-2 (Fig. 19A). El tratamiento con 25 mM NH₄Cl causó una reducción significativa del crecimiento de C-S8c1. Sin embargo, este tratamiento no afectó el crecimiento del mutante c2. Estos resultados confirman la resistencia del mutante c2 a la inhibición de la acidificación endosomal con NH₄Cl.

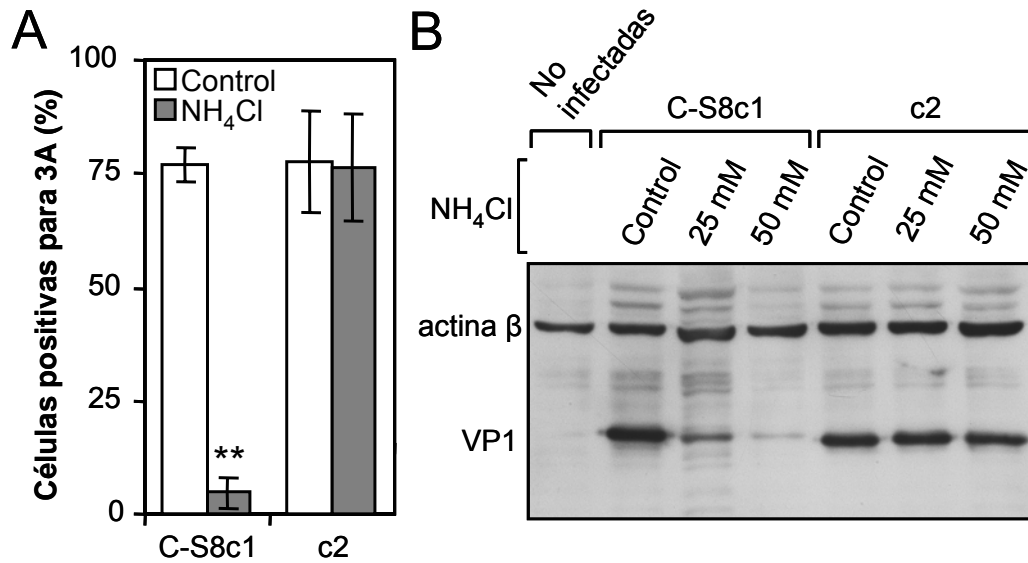


Fig. 18. La infección con el mutante c2 es resistente al tratamiento con NH₄Cl.

A) El NH₄Cl no impide la expresión de proteínas no estructurales en las células infectadas con en el mutante c2. Las células BHK-21 tratados o no con 25 mM NH₄Cl fueron infectadas (m.d.i. de 10) con el mutante c2 o con C-S8c1. 4 h p.i. el número de células positivas para la proteína 3A fue determinado mediante inmunofluorescencia utilizando el AcP 163 y un Ac secundario acoplado a AF555.

B) El NH₄Cl no reduce la producción de la proteína VP1 en las células infectadas con el mutante c2. Las células tratadas o no con distintas concentraciones de NH₄Cl fueron infectadas con C-S8c1 o con el mutante c2 (m.d.i. de 0.5). La cantidad de proteína a las 8 h p.i. VP1 fue estimada mediante *western blot* utilizando el AcM SD6. La membrana se reincubó con un Ac anti-actina β, utilizado como control de carga.

5.2.7 El mutante c2 es resistente al tratamiento con Con A

La infección con VFA en células IBRS-2 es más sensible al tratamiento con Con A, que en células BHK-21 (Fig. 13). Por ello, se utilizaron las células IBRS-2 para determinar el efecto de la inhibición de la acidificación endosomal con Con A sobre la infección del mutante c2 (Fig. 19B). Mientras que el tratamiento con Con A produjo una reducción significativa del título viral de C-S8c1, éste no afectó a la infección con el mutante c2. Estos resultados confirman la resistencia del mutante c2 a diferentes tratamientos que resultan en una inhibición de la acidificación de los endosomas.

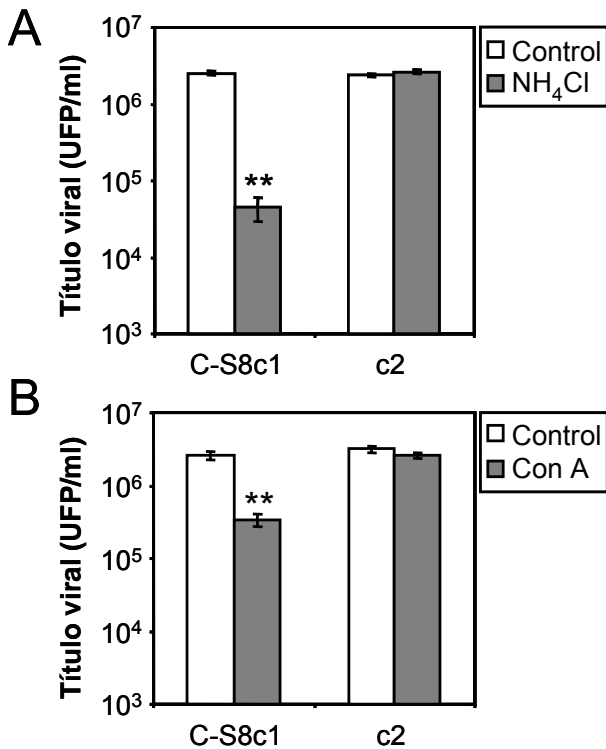


Fig. 19. La infección de células IBRS-2 con el mutante c2 es resistente al tratamiento con NH₄Cl y Con A.

A) El NH₄Cl no inhibe el crecimiento del mutante c2 en células IBRS-2. Las monocapas tratadas o no con NH₄Cl (25 mM) fueron infectadas con el virus c2 o con C-S8c1 (m.d.i. de 0.5); el título viral se determinó 8 h p.i.

B) La Con A no inhibe el crecimiento del virus c2 en células IBRS-2. Las células fueron tratadas con Con A (100 nM) e infectadas como en (A).

5.2.8 Disección del papel funcional de los cambios de aminoácido encontrados en la cápsida del mutante c2

Para evaluar el papel de cada una de las mutaciones encontradas en la cápsida del virus c2, éstas fueron introducidas en el clon infeccioso pMT28 (que contiene el DNA correspondiente a la secuencia genómica completa del virus C-S8c1). Se construyeron tres plásmidos recombinantes: un doble mutante que codifica el cambio VP3 A118V y el cambio VP1 N47D, así como los correspondientes mutantes sencillos. El RNA viral fue sintetizado a partir de cada uno de los clones infecciosos mediante transcripción *in vitro* a partir del promotor de la RNA polimerasa del bacteriófago SP6, y utilizado para transfectar células BHK-21. Los virus recuperados de estas transfecciones fueron amplificados mediante dos pases en esta línea celular y se determinó la secuencia consenso del RNA que codifica la región P1 de la poliproteína viral. Las mutaciones introducidas en los clones infecciosos se mantuvieron en estos virus, no detectándose cambios adicionales (datos no mostrados). El tamaño de placa de los virus recuperados fue comparable al del virus C-S8c1 recuperado del clon pMT28, salvo para el virus mutante simple VP3 118V, que presentó un tamaño de placa ligeramente inferior (Fig. 20).

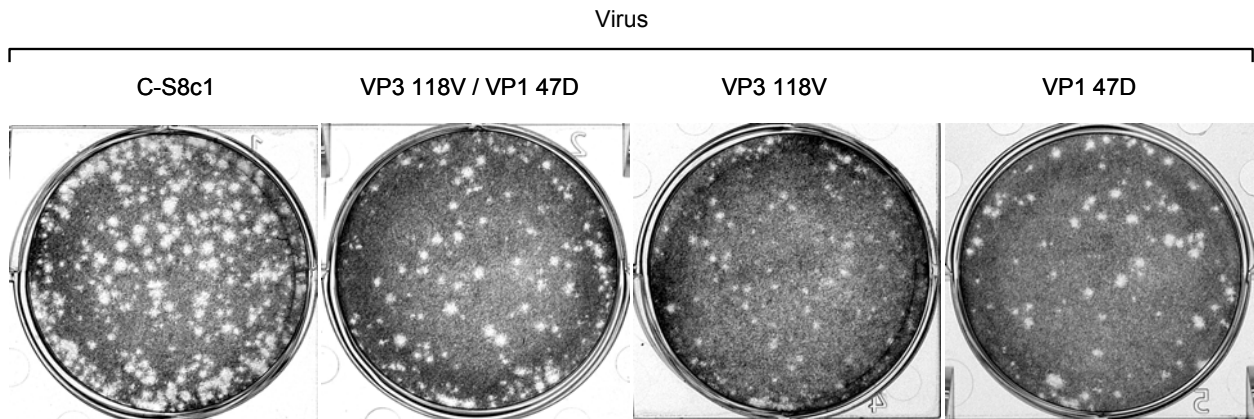


Fig. 20. Placas de lisis producidas por los virus recuperados de clones infecciosos.

Las células BHK-21 fueron infectadas con los virus indicados durante 24 h en medio semisólido. Posteriormente fueron fijadas y teñidas con cristal violeta.

Cuando se determinó el efecto del NH_4Cl sobre el crecimiento de los virus recuperados de los clones infecciosos (Fig. 21A), se observó una inhibición significativa para los virus C-S8c1 y VP1 47D. Sin embargo, el crecimiento de los virus VP3 118V/VP1 N47D, y VP3 118V no fue inhibido significativamente por el tratamiento con NH_4Cl . Estos resultados correlacionaron con el número de células infectadas positivas para 3A observadas mediante inmunofluorescencia (Fig. 21C), así como con los niveles de producción de VP1 determinados mediante *western blot* (Fig. 21D). Estos resultados indican, que el cambio VP3 A118V permite el escape del VFA a la inhibición por NH_4Cl .

A continuación, se analizó la sensibilidad a pH ácido de los mutantes y el virus C-S8c1 recuperados del clon infeccioso (Fig. 21B). El doble mutante VP3 118V/VP1 47D y el mutante sencillo VP3 118V mostraron una sensibilidad incrementada a pH ácido (pH_{50} : 6.94 y 6.92, respectivamente) frente a la exhibida por C-S8c1 y el mutante sencillo VP1 47D (pH_{50} : 6.60 y 6.57, respectivamente). Estos resultados sugieren que el incremento en la sensibilidad a pH ácido de las partículas de VFA se debe al cambio VP3 A118V, y que esto hace posible su escape de la inhibición por NH_4Cl .

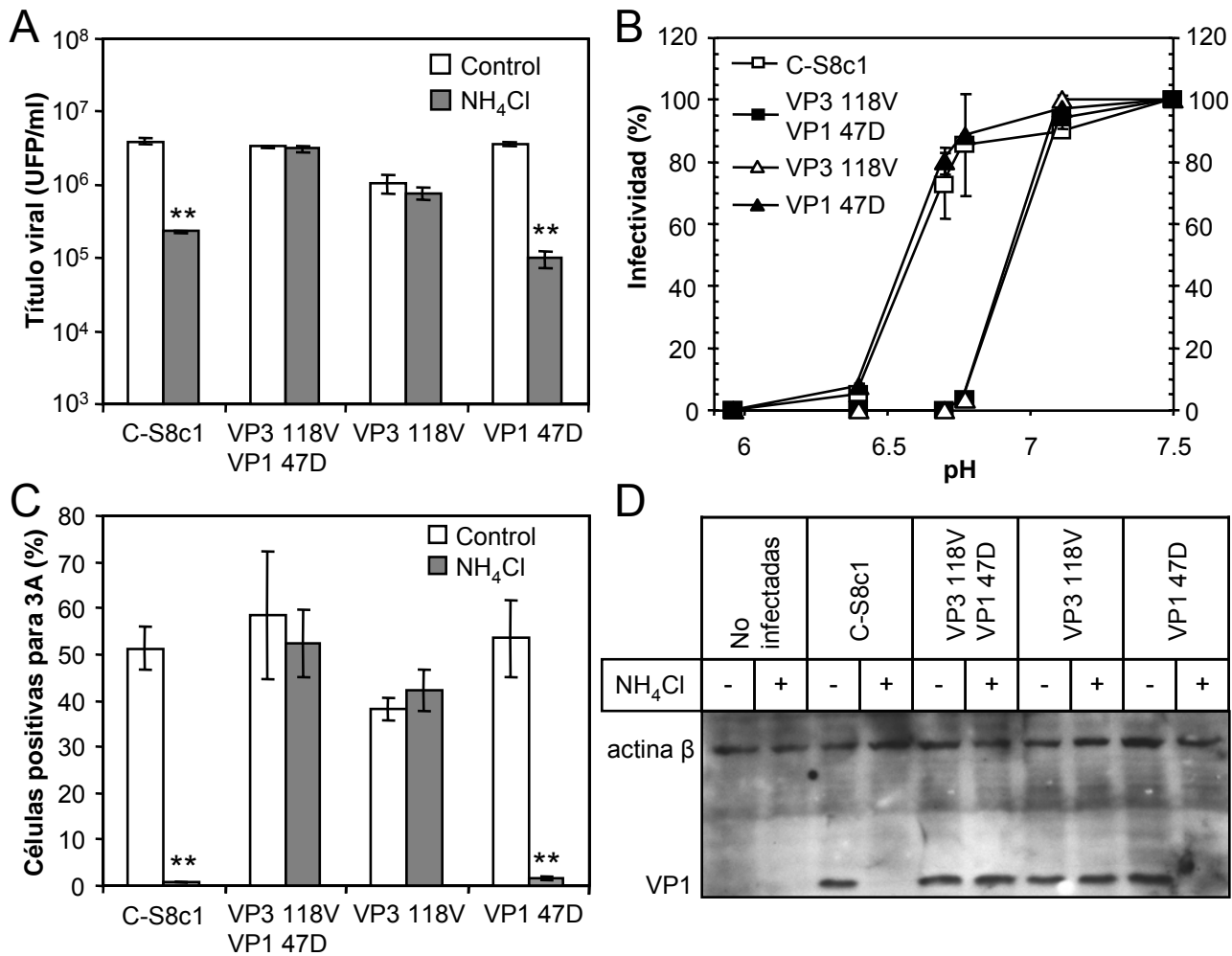


Fig. 21. El cambio A118V en la proteína VP3 es responsable de la resistencia a NH₄Cl y del incremento en la sensibilidad a pH ácido del mutante c2.

A) Sensibilidad al tratamiento con NH₄Cl de los virus recuperados de los distintos clones infecciosos. Se infectaron (m.d.i. de 0.5) monocapas de células BHK-21, tratadas o no con 25 mM NH₄Cl. El título viral se determinó 8 h p.i.

B) Incremento de la sensibilidad a pH ácido de los virus recuperados de los distintos clones infecciosos. Las mismas UFP de cada uno de los virus fueron tratadas con tampones de diferente pH (apartado 4.12). La infectividad tras el tratamiento fue determinada mediante titulación en células BHK-21, y se expresa como porcentaje sobre la obtenida tras el tratamiento con tampón pH 7.5.

C) Contaje de células positivas para la proteína viral 3A mediante inmunofluorescencia. Se infectaron (m.d.i. de 10) células, tratadas o no con 25 mM NH₄Cl. A las 6 h p.i. las células se fijaron y procesaron para inmunofluorescencia, utilizando el AcP 163 y un Ac secundario acoplado a AF594.

D) Análisis de la producción de VP1 en las células tratadas con 25 mM NH₄Cl e infectadas con los virus indicados (m.d.i. de 0.5). Las células se lisaron a las 8 h p.i. y la proteína VP1 fue detectada con el AcM SD6. Las membranas fueron reincubadas también con un Ac anti-actina β como control de carga.

5.2.9 El cambio VP3 A118V es suficiente para conferir resistencia a NH₄Cl y Con A

Se analizó la resistencia de los virus recuperados de los clones infecciosos a la inhibición de la acidificación endosomal en células IBRS-2 (Fig. 22A). El NH₄Cl inhibió significativamente el crecimiento de los virus C-S8c1 y VP1 47D, no viéndose afectado el crecimiento de los virus VP1 47D/VP3 118V, y VP3 118V, de manera análoga a lo observado en las células BHK-21 (Fig. 21A). Asimismo, y como se observó con el virus c2 (Fig. 19B), el título viral recuperado tras la infección de células IBRS-2 con los virus C-S8c1 y VP1 47D fue reducido significativamente por el tratamiento con Con A, que no afectó a los rendimientos de los virus VP1 47D/VP3 118V y VP3 118V (Fig. 22B). Estos resultados indican que el cambio VP3 A118V es suficiente para permitir el escape del mutante c2 a la inhibición por NH₄Cl y Con A en células IBRS-2.

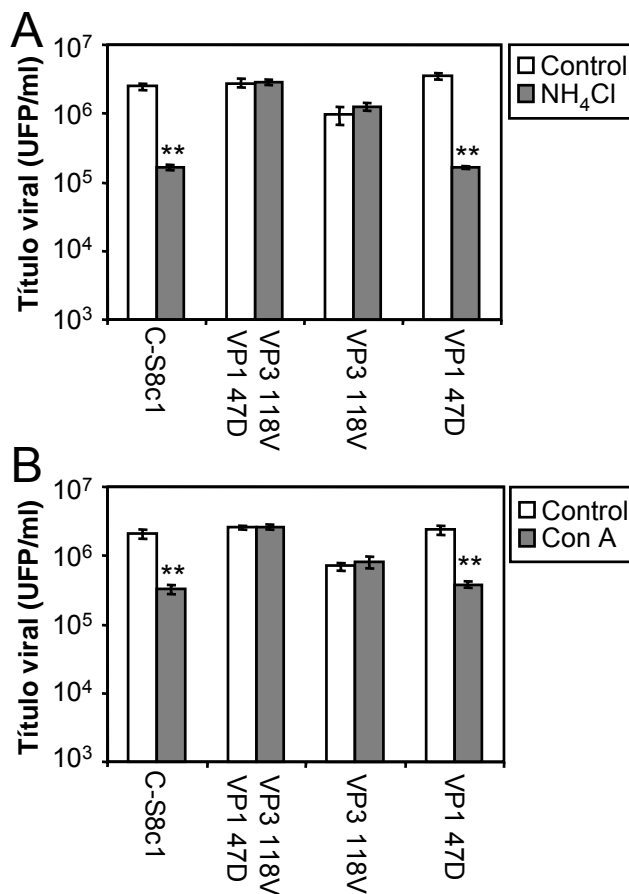


Fig. 22. Análisis de la resistencia a NH₄Cl y Con A de los virus recuperados de clones infecciosos en células IBRS-2.

A) Las células fueron infectadas (m.d.i. de 0.5), en presencia o en ausencia de 25 mM NH₄Cl, con los diferentes virus recuperados de clones infecciosos. El título viral fue determinado 8 h p.i.

B) Las células IBRS-2 fueron tratadas con Con A (100 nM) e infectadas de la misma manera que en (A).

5.2.10 Estabilidad de los viriones de mutantes con el cambio VP3 A118V durante su purificación en gradientes de sacarosa

El virus c2 (portador de las mutaciones VP3 A118V y VP1 N47D), el virus recuperado del clon infeccioso VP3 118V, y el virus C-S8c1 fueron crecidos en células BHK-21 en condiciones de marcaje metabólico con ³⁵S (apartado 4.18). Los viriones recuperados de la

Resultados

infección fueron purificados mediante centrifugación en un gradiente de sacarosa (7.5 - 30%) (Fig. 23A). Se observó un único pico de radiactividad para los tres virus, que correspondía a los viriones con un coeficiente de sedimentación de 140 S. A continuación, se recogieron las fracciones que contenían los viriones de cada uno de los virus y se sometieron a diálisis para eliminar la sacarosa, y se centrifugaron en un nuevo gradiente de sacarosa (7.5 - 45%). Los resultados de este segundo gradiente se muestran en la Fig. 23B. En el caso de los virus c2 y VP3 118V, sólo se obtuvo un pico de radiactividad que correspondía a un coeficiente de sedimentación (12 S) inferior al de los viriones. El coeficiente de sedimentación de 12 S es el descrito para las subunidades pentaméricas de la cápsida (apartado 2.4.1.4.1), lo que sugiere la disociación total en pentámeros de los viriones. Un pico radiactivo de 12 S también se pudo observar, de forma minoritaria, para C-S8c1; en este caso, la mayor parte de la radiactividad migró con un coeficiente de sedimentación más elevado (140 S), correspondiente a los viriones (apartado 2.4.1.4.1). Estos resultados sugieren que las cápsidas de los virus c2 y VP3 118V son más lábiles en las condiciones de purificación empleadas, disociándose totalmente, tras el primer gradiente (7.5 - 30%) en subunidades pentaméricas. Los resultados indican, también, que la mutación VP3 A118V es suficiente para conferir esta menor estabilidad.

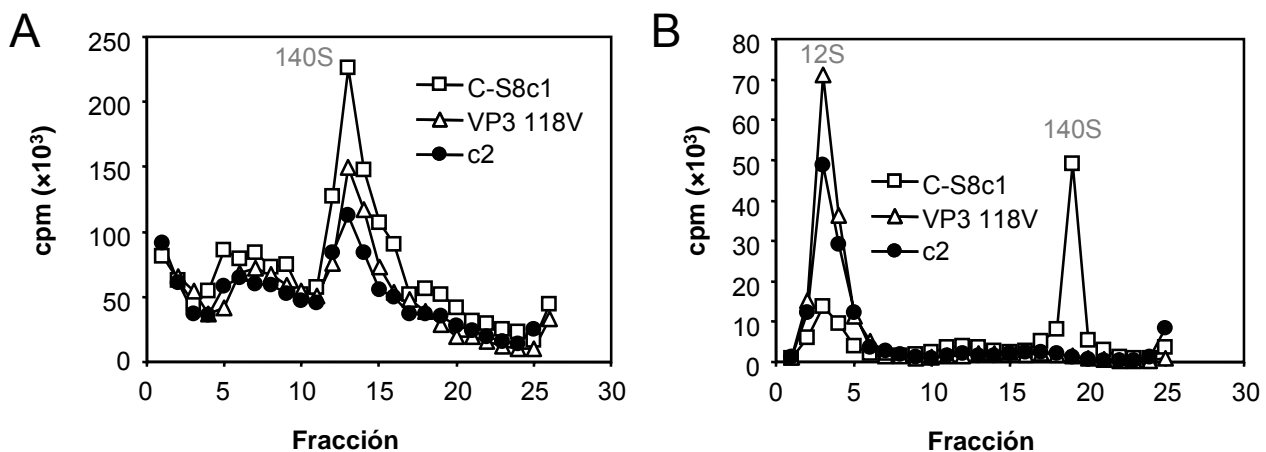


Fig. 23. Purificación y análisis de los viriones resistentes a NH_4Cl mediante sedimentación en gradientes de sacarosa.

A) Distribución de los viriones de los virus C-S8c1, el mutante c2, y el virus recuperado del clon infeccioso VP3 118V en un gradiente de sacarosa (7.5 - 30%). Las células BHK-21 fueron infectadas con los virus y sometidas a marcaje metabólico con ^{35}S . Los virus recuperados fueron purificados como se describe en el apartado 4.18. El contenido de los gradientes fue fraccionado, indicándose la radiactividad recuperada en cada fracción.

B) Las fracciones conteniendo el pico de viriones (140 S) del gradiente de (A) fueron juntadas, dializadas y cargadas en un gradiente de sacarosa (7.5 - 45%). Los gradientes fueron fraccionados y analizados como en (A). Se pueden observar el pico de 12 S, correspondiente a pentámeros, y el de 140 S.

5.3 Aislamiento y caracterización de mutantes de VFA resistentes a pH ácido

5.3.1 Aislamiento de mutantes de VFA con resistencia incrementada a pH 6

Puesto que la existencia de mutantes con mayor estabilidad a pH ácido ha sido descrita para otros serotipos de VFA (Twomey et al., 1995), se consideró de interés aislar y caracterizar mutantes resistentes a pH 6 a partir de la población del virus C-S8c1. Para ello (ver apartado 4.11), el virus se incubó 30 min a pH 6 y se inoculó en monocapas de células BHK-21. Tras 48 h de infección en medio semisólido se observaron aproximadamente el $0.0029 \pm 0.0005\%$ de placas de lisis, respecto a la infección con virus que no había sufrido el tratamiento ácido (frecuencia de selección de $2,9 \times 10^{-5}$). Se picaron 6 de estas placas, (denominadas m1, m2, m3, m4, m5 y m6), que fueron amplificadas mediante inoculación en células BHK-21. Los virus recuperados fueron sometidos a un nuevo tratamiento con pH 6 y amplificación en células BHK-21.

Todos los clones biológicos resistentes a pH ácido recuperados mostraron una sensibilidad reducida al tratamiento con pH 6, en comparación con la de la población del virus C-S8c1 parental (Fig. 24A). Mientras que el título del virus C-S8c1 se redujo en torno a 4 logaritmos por el tratamiento con pH 6, la reducción observada en los virus seleccionados tras el tratamiento con pH 6 fue, en el mayor de los casos de un logaritmo. El comportamiento de los mutantes fue homogéneo, siendo el virus m1 el que mostró una mayor resistencia a pH 6 fue el más resistente a pH 6. Estos resultados confirman la existencia de variantes de VFA más resistentes a pH ácido dentro de la población del virus C-S8c1. No obstante, el incremento en la estabilidad de estos mutantes es limitado, ya que su incubación con un tampón pH 5 produjo una drástica reducción de la infectividad (Fig. 24B).

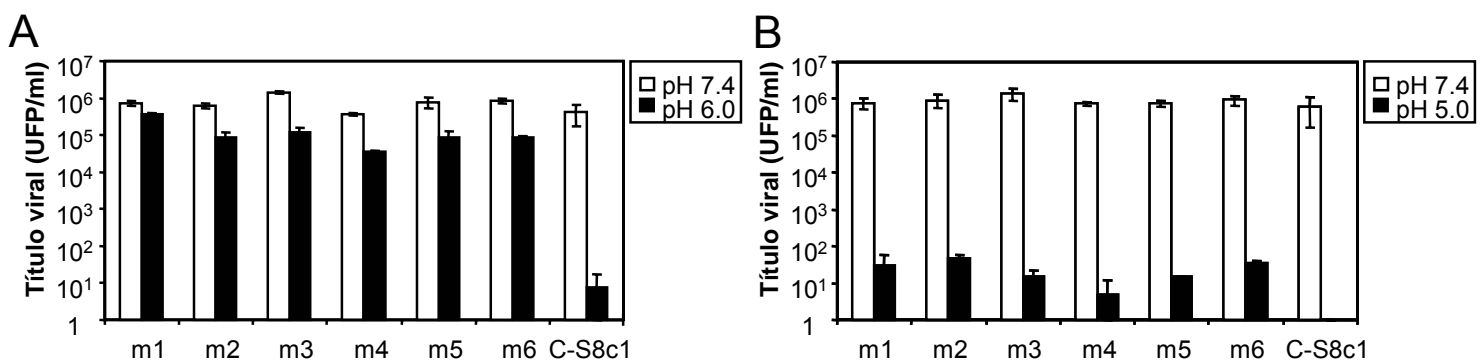


Fig. 24. Resistencia a pH de mutantes de VFA seleccionados tras tratamiento con pH 6.

A) Los virus m1 - m6 muestran un aumento en la resistencia al tratamiento con pH 6.0 con respecto al virus parental C-S8c1. Las mismas UFP de cada una de las poblaciones virales, se incubaron con tampones de diferente pH (ver apartado 4.12). El título viral cada tratamiento fue determinado en células BHK-21.

B) Mismo experimento que en (A) pero tratando con pH 5.0 en lugar de 6.0.

5.3.2 La infección con mutantes con resistencia incrementada a pH 6 muestra una mayor sensibilidad frente a la inhibición de la acidificación endosomal

Como parte de su caracterización, se estudió la sensibilidad de los virus resistentes a pH ácido frente a la inhibición de la acidificación endosomal inducida con NH_4Cl (Fig. 25A). Los seis mutantes analizados mostraron una sensibilidad incrementada al tratamiento con NH_4Cl respecto a la del virus C-S8c1. En este experimento también se incluyó el mutante resistente a NH_4Cl c2 como control. Los virus resistentes a pH ácido presentaron también un incremento en la sensibilidad a la inhibición de la acidificación endosomal con Con A (datos no mostrados).

Se analizó también la sensibilidad a pH ácido de los mutantes m1 - m6 (Fig. 25B). En todos los casos, el valor de pH_{50} fue inferior al de C-S8c1 (6.58). Los virus m2 - m6 presentaron valores de pH_{50} muy similares (6.18, 6.22, 6.22, 6.24 y 6.20 respectivamente), mientras que el virus m1 mostró un valor de pH_{50} ligeramente inferior (6.09). Estos resultados indican que el aumento de la estabilidad a pH ácido del virión se correlaciona con un incremento en la sensibilidad al tratamiento con NH_4Cl . Este efecto es el contrario al observado en los virus resistentes a NH_4Cl , en los cuales un incremento en la sensibilidad del virión a pH ácido suponía una reducción en la sensibilidad al tratamiento con NH_4Cl .

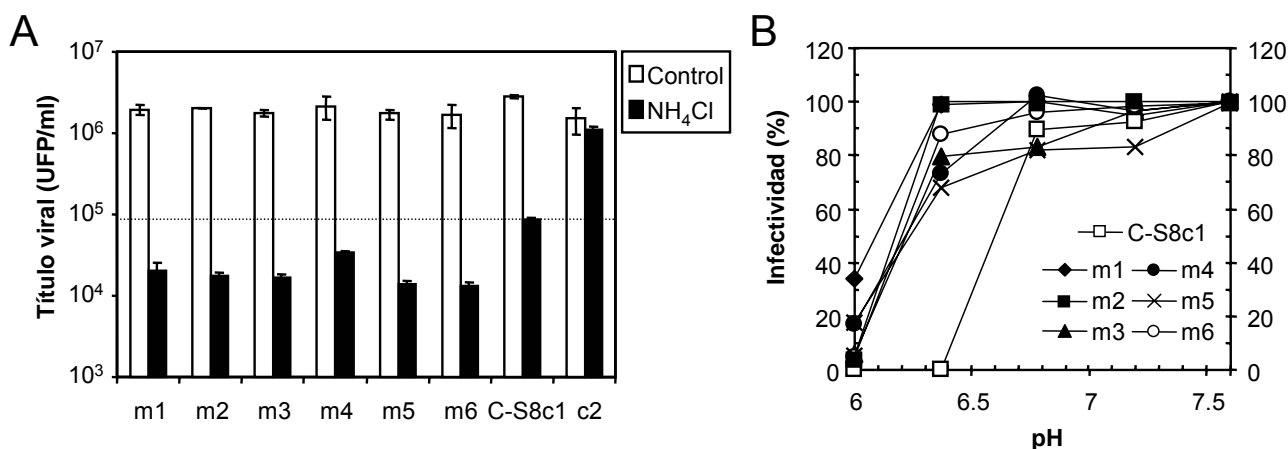


Fig. 25. Correlación entre la sensibilidad a NH_4Cl y el incremento en la resistencia a pH ácido de los mutantes de VFA.

A) Aumento de la sensibilidad al tratamiento con NH_4Cl en los mutantes con resistencia a pH ácido incrementada. Las monocapas de células BHK-21, tratadas o no con 25 mM NH_4Cl , fueron infectadas (m.d.i. de 0.5) con los diferentes los virus resistentes a pH ácido (m1 - m6), C-S8c1, y el virus c2 resistente al tratamiento con NH_4Cl . El título viral se determinó 8 h p.i.

B) Incremento de la resistencia a pH ácido en los mutantes de VFA m1 - m6. Las mismas UFP de cada uno de los virus fueron tratadas con tampones de diferentes pH y a continuación neutralizadas. La infectividad tras cada tratamiento fue determinada mediante titulación en células BHK-21, y se expresa como porcentaje sobre la obtenida con tampón pH 7.6.

5.3.3 Análisis de las mutaciones en la cápsidas seleccionados en los virus con resistencia incrementada a pH 6

El RNA codificante de la región P1 de los virus con resistencia incrementada a pH 6 m1, m2, m3, m4, m5 y m6 fue integralmente secuenciado. Los cambios de nucleótido, respecto a la secuencia del C-S8c1, encontrados en la población sometida a los dos tratamientos ácidos sucesivos, se indican en la Tabla VI.

Tabla VI. Sustituciones de nucleótidos encontradas en VFAs seleccionados tras dos tratamientos con pH 6^a

Región genómica	Virus						
	m1	m2	m3	m4	m5	m6	
VP4							
VP2	T1996C F34L						
VP3	A2576T ^b D9V	A2576T ^b D9V	A2576T ^b D9V	A2576T ^b D9V	A2576T ^b D9V	A2576T ^b D9V	
VP1	A3256G N17D	A3256G N17D	A3256G N17D	A3256G N17D	A3256G N17D	A3256G N17D	A3256G N17D
						C3390T ^b	
							C3750T

^a Se muestran las mutaciones encontradas respecto a la secuencia determinada para el preparado de C-S8c1 utilizado, que mostró la sustitución silenciosa de nucleótido T3117C, respecto a la publicada por Toja et al. (1999). Los cambios de aminoácido se indican en negrita.

^b Mezcla de nucleótidos en esa posición (ver Fig. 26).

En todos los casos se encontró impuesta la sustitución no sinónima A3256G que origina el cambio VP1 N17D. Además, cinco de los seis mutantes analizados (m1, m2, m3, m4 y m5) presentaron mezcla de nucleótidos en la posición 2576, entre A, presente en C-S8c1, y T, esta última responsable del cambio de aminoácido VP3 D9V (Fig. 26A). Sólo el virus m1 presentó un cambio adicional de nucleótido dominante en la población, en la posición T1996C, que codifica el cambio de aminoácido VP2 F34L. El resto de las sustituciones encontradas fueron silenciosas.

Cuando el RNA de la región P1 de los virus con mayor resistencia a pH 6 fue secuenciado en las poblaciones virales sometidas únicamente al primer tratamiento con pH 6, se observó en todos los mutantes que la sustitución A3256G responsable del cambio VP1 N17D se encontraba ya impuesta (datos no mostrados). Por otra parte, la sustitución A2576T, que origina el cambio VP3 D9V, sólo se encontró como trazas en los cromatogramas de las secuencias de los mutantes m3 y m4, indicando que su imposición tuvo lugar posteriormente (Fig. 26A). La observación detallada de los cromatogramas indicó, también, la presencia de mezcla T1996C en el virus m1 (Fig. 26B). La proporción de C en esta posición se incrementó en la población sometida a dos tratamientos con pH 6.

La presencia de la misma mutación, VP1 N17D, en todos los virus con resistencia incrementada a pH 6 analizados, puede explicar el comportamiento homogéneo observado en los

Resultados

ensayos de infectividad con diferente pH ácido. Ninguna de las sustituciones de aminoácido encontradas en los virus m1 - m6 se localizó en posiciones invariantes de la cápsida de VFA entre aislados de los 7 serotipos (Carrillo et al., 2005). Estos resultados sugieren que el incremento en la resistencia a pH ácido de las cápsidas de VFA observado en los mutantes m1, m2, m3, m4, m5 y m6 se debe a la sustitución VP1 N17D.

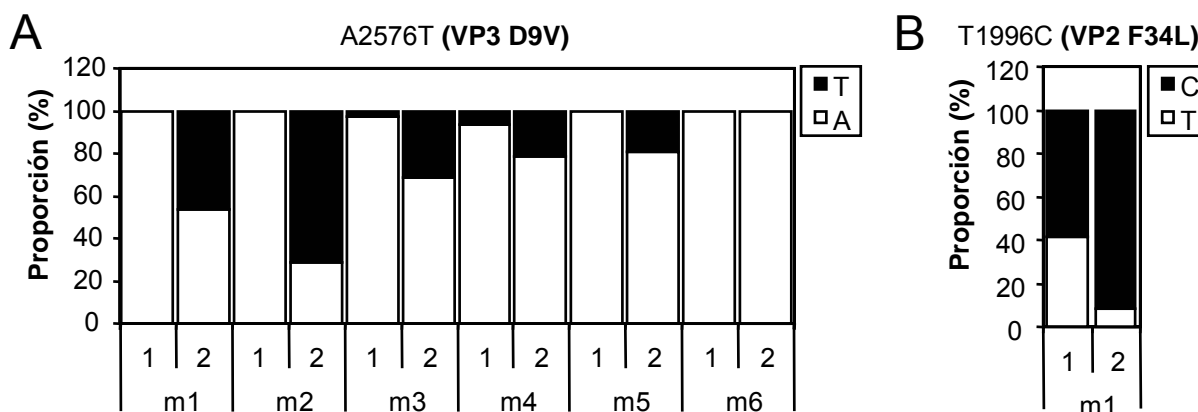


Fig. 26. Estimación de la proporción de los diferentes nucleótidos en las posiciones 2576 y 1996 de los mutantes con resistencia a pH 6 incrementada.

A) Proporción aproximada de A y T en la posición 2576 en los virus m1 - m6, estimada tras el primer (1) y segundo (2) tratamiento con pH 6.

B) Proporción aproximada de C y T en la posición 1996 del mutante m1, estimada tras el primer (1) y segundo (2) tratamiento con pH 6.

5.3.4. Localización espacial de las mutaciones seleccionadas en la cápsida en virus con resistencia incrementada a pH 6

La localización en la estructura tridimensional de la cápsida de C-S8c1 (Lea et al., 1994) de los residuos mutados en los virus m1 - m6 se muestra en la Fig. 27. Las sustituciones VP2 F34L, VP1 N17D y VP3 D9V se localizaron en zonas desestructuradas de estas proteínas (Fig. 27A). Las sustituciones VP1 N17D y VP3 D9V se situaron en los extremos N-terminales de ambas proteínas, y el cambio F34L se situó en el bucle A-B de VP2. Tanto el cambio VP1 N17D, encontrado en todos los mutantes con resistencia a pH 6 incrementada, como la sustitución VP2 F34L (mutante m1) se disponen en regiones internas de la cápsida (Fig. 27B). En cuanto al cambio VP3 D9V, esta posición se localiza muy próxima al poro de la cápsida y está implicada en interacciones interprotoméricas, participando en un puente salino con VP1 K109 (Mateo y Mateu, 2007). Se han descrito cambios en esta posición en derivados de C-S8c1 recuperados de infecciones persistentes en cultivos celulares (Diez et al., 1990; Herrera et al., 2008; Toja et al., 1999).

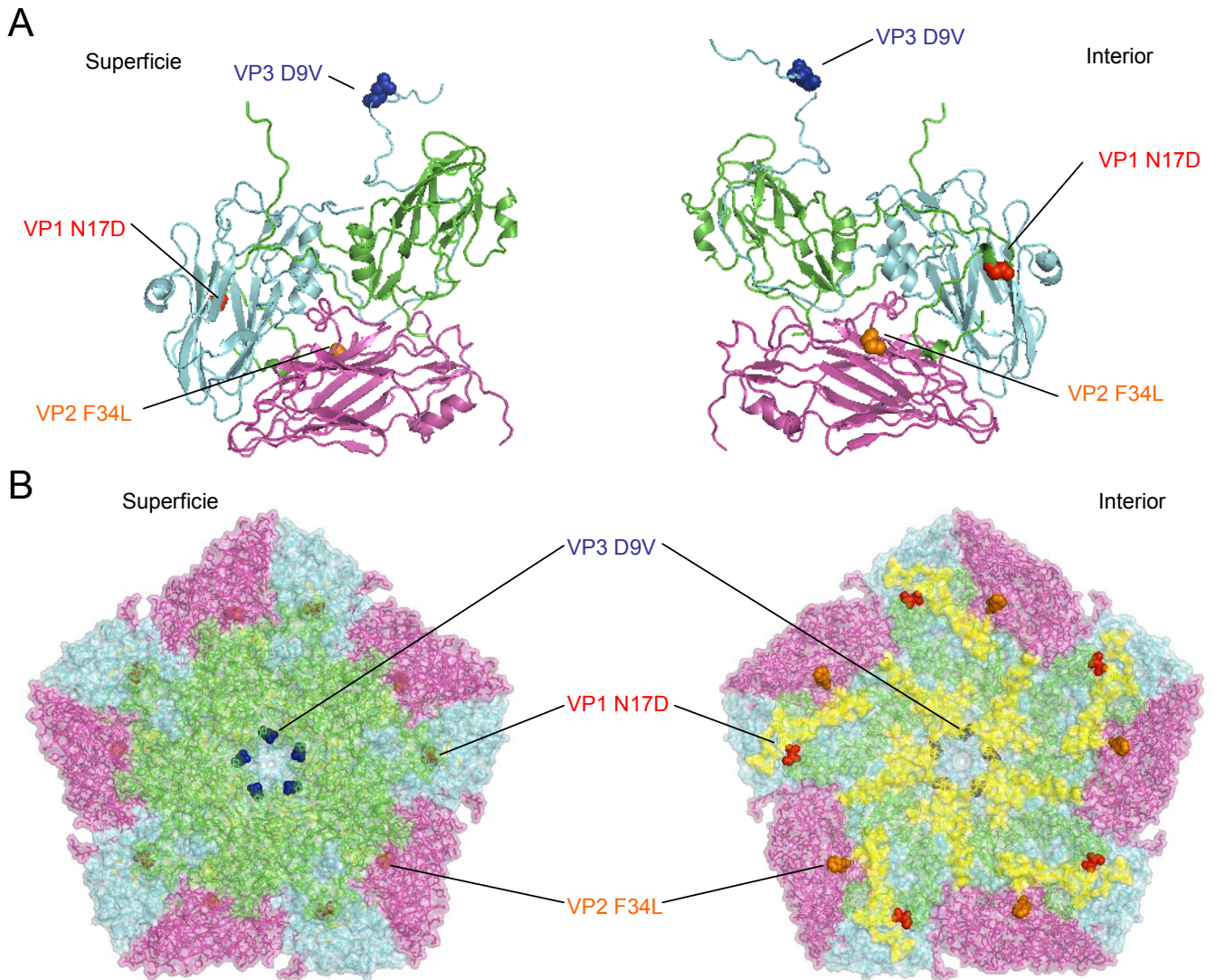


Fig. 27. Localización espacial de los residuos mutados en la cápsida de los virus con resistencia incrementada a pH 6.

A) Vistas de la superficie externa y la cara interna del protómero biológico de C-S8c1. La proteína VP4 no se muestra por simplificación.

B) Vista de la superficie externa y la cara interna de la subunidad pentamérica de la cápsida.

Código de colores: VP1 en verde; VP2 en magenta, VP3 en cian y VP4 en amarillo.

5.3.5 El cambio VP1 N17D es responsable del incremento en la resistencia a pH ácido

Para evaluar el papel del cambio VP1 N17D encontrado en la cápsida de los virus con resistencia incrementada a pH 6, este reemplazamiento fue introducido en el clon infeccioso pMT28 -que, como se ha comentado anteriormente, contiene el DNA correspondiente a la

Resultados

secuencia genómica completa de C-S8c1-. El RNA viral fue sintetizado a partir de este clon infeccioso (VP1 17D) mediante transcripción *in vitro* y se utilizó para transfectar células BHK-21. El virus recuperado de esta transfección fue amplificado mediante dos pases esta línea celular y se determinó la secuencia consenso del RNA que codifica la región P1 de la poliproteína viral. La mutación VP1 N17D se mantuvo en el virus, no detectándose cambios adicionales (datos no mostrados). A continuación, se evaluó la resistencia a pH ácido de dicho mutante. El virus VP1 17D presentó una resistencia incrementada a pH ácido en comparación con el virus C-S8c1 recuperado a partir del clon infeccioso pMT28 (Fig. 28). El valor de pH_{50} para el virus VP1 17D fue 6.20, mientras que el valor calculado para C-S8c1 fue 6.60. Estos resultados indican que el cambio VP1 N17D es responsable del incremento en la resistencia a pH ácido del VFA.

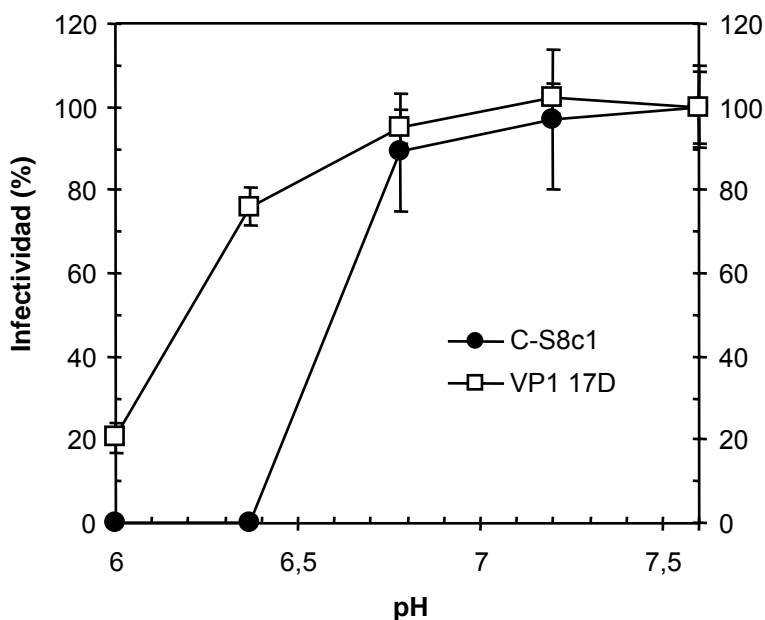


Fig. 28. El cambio VP1 N17D confiere al VFA resistencia incrementada a pH ácido.

Incremento de la resistencia a pH ácido del mutante VP1 17D con respecto a C-S8c1. Las mismas UFP de cada uno de los virus, recuperados de transfecciones realizadas con RNA sintetizado a partir de los clones infecciosos pMT28 (C-S8c1) y VP1 17D, fueron tratadas con tampones de diferente pH y a continuación neutralizadas. La infectividad tras el tratamiento con cada uno de los tampones fue determinada mediante titulación en células BHK-21, y se expresa como porcentaje sobre la obtenida con tampón pH 7.6.

5.4 Análisis de la internalización de VFA inactivado químicamente

5.4.1 Análisis de los viriones de VFA inactivados con BEI

Las vacunas frente a VFA utilizadas en la actualidad se basan en la inactivación por tratamiento con BEI (Bahnmann, 1975; Barteling, 2004) de partículas de VFA producidas en cultivos celulares. La inactivación con BEI preserva en buena medida la estructura antigénica e inmunogénica de VFA (Bahnmann, 1975; Patil et al., 2002). Por ello, pareció de interés caracterizar los posibles mecanismos de internalización de partículas de VFA inactivadas. Primeramente, se estudiaron posibles efectos del tratamiento con BEI sobre la integridad de las partículas de VFA. Se realizó una purificación de viriones de VFA inactivados con BEI mediante ultracentrifugación en gradiente de sacarosa (Fig. 29A). A continuación, se midió la absorbancia a 280 nm y a 260 nm en cada una de las fracciones para estimar la cantidad de proteína y ácido nucleico presente en cada una de las fracciones. La distribución de las dos medidas de absorbancia a lo largo del gradiente presentó un comportamiento muy similar al del virus infeccioso (Fig. 23A). Una alícuota de la fracción 12 (máximo de absorbancia) fue examinada al microscopio electrónico mediante tinción negativa (apartado 4.9.2), lo que confirmó la presencia de partículas esféricas de 30 nm de diámetro, que corresponden a la arquitectura de la partícula viral (Fig. 29B). Este resultado sugiere que el tratamiento con BEI mantiene la integridad de la partícula viral.

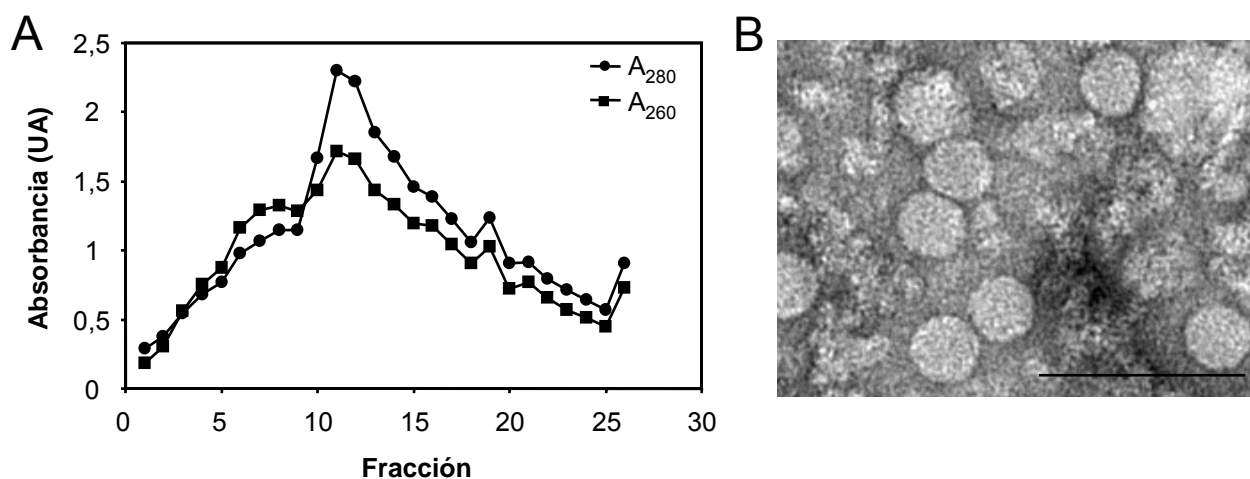


Fig. 29. Análisis de partículas de VFA inactivadas con BEI mediante sedimentación en gradiente de sacarosa y microscopía electrónica.

A) Análisis de absorbancia en un gradiente de sacarosa (7.5 - 45%) empleado para purificar el virus C-S8c1 inactivado con BEI. A_{280} y A_{260} indican la absorbancia de cada una de las fracciones a 280 y 260 nm, respectivamente.

B) Micrografía electrónica de las partículas de VFA contenidas en la fracción 12 del gradiente (A). Barra: 100 nm.

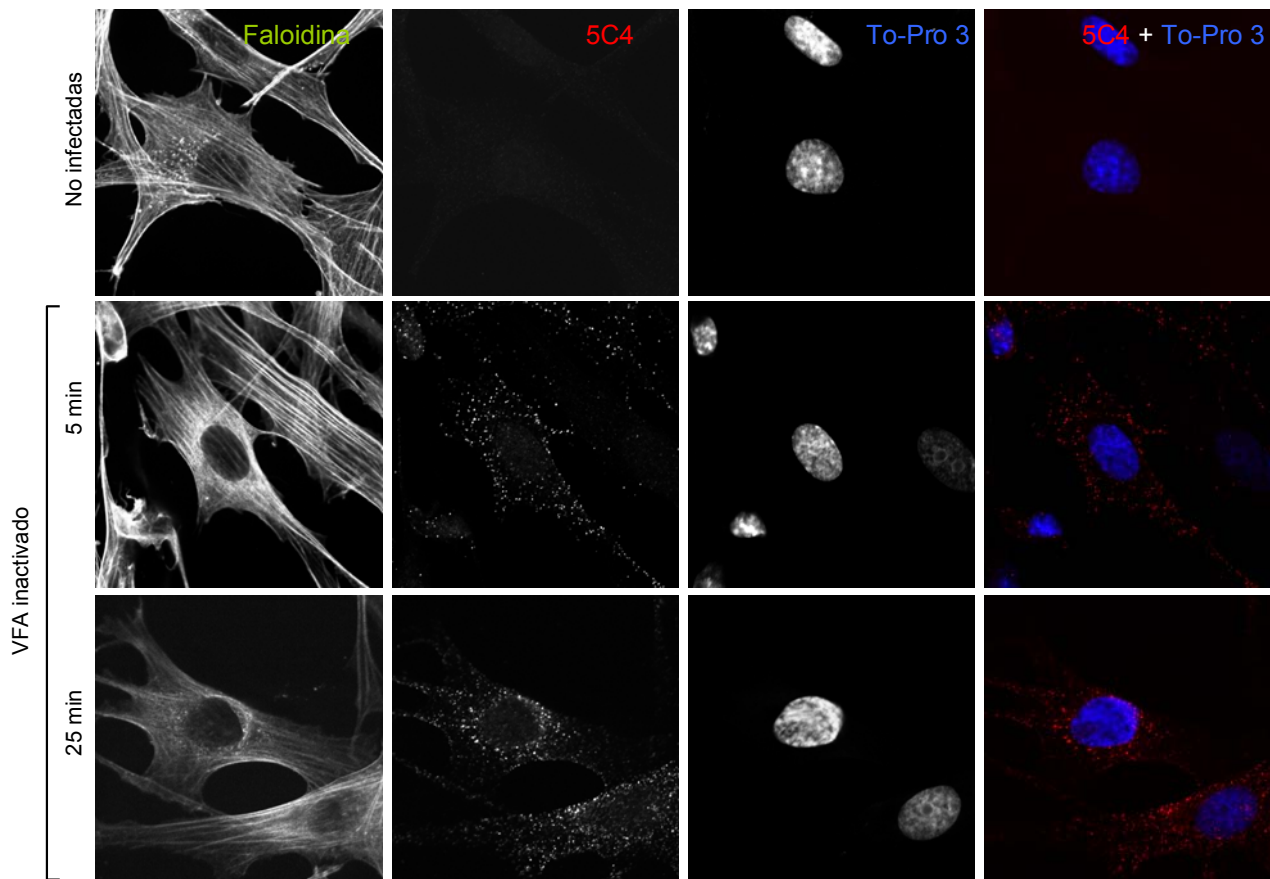


Fig. 30. Las partículas de VFA inactivadas con BEI son internalizadas por las células.

Las células BHK-21 fueron incubadas con partículas de VFA (cantidad equivalente a una m.d.i. de 100) durante 5 ó 25 min a 37° C. A continuación, las células fueron fijadas y se procesaron para inmunofluorescencia indirecta utilizando el AcM 5C4 y un Ac secundario acoplado a AF555 (rojo) para detectar el virus. La tinción de la F-actina celular con faloidina revela la forma de las células. Los núcleos fueron teñidos con To-Pro 3. Las imágenes corresponden a secciones ópticas a nivel del plano medio de la célula, obtenidas mediante microscopía confocal. Barra: 20 µm.

5.4.2 El VFA inactivado es internalizado en células susceptibles

A continuación, se evaluó la capacidad de los viriones inactivados con BEI de ser internalizados en células susceptibles a la infección por VFA. Los viriones inactivados fueron incubados en cantidad equivalente (UFP/célula, antes de la inactivación) a una m.d.i. de 100, con las células BHK-21 durante 5 o 25 min a 37° C. A continuación, las células fueron fijadas y procesadas para inmunofluorescencia utilizando el AcM 5C4. En las células incubadas con los virus inactivados se observó un patrón punteado (Fig. 30). Este patrón corresponde a las partículas de VFA inactivadas con BEI que, tras 5 min de incubación, se localizan preferentemente cerca de la periferia celular; a los 25 min la fluorescencia aparece en la periferia nuclear. El patrón de tinción obtenido con el AcM 5C4 no se observó en las células incubadas sin

virus, confirmado su especificidad. Puesto que se trata de secciones ópticas obtenidas mediante microscopía confocal que corresponden al plano medio de las células, estos resultados indican que las partículas de VFA inactivadas con BEI son internalizadas en las células BHK-21. Este patrón de tinción se corresponde con el observado en células infectadas con VFA (Fig. 12). Se obtuvieron similares resultados cuando se emplearon células IBRS-2 para este análisis (datos no mostrados).

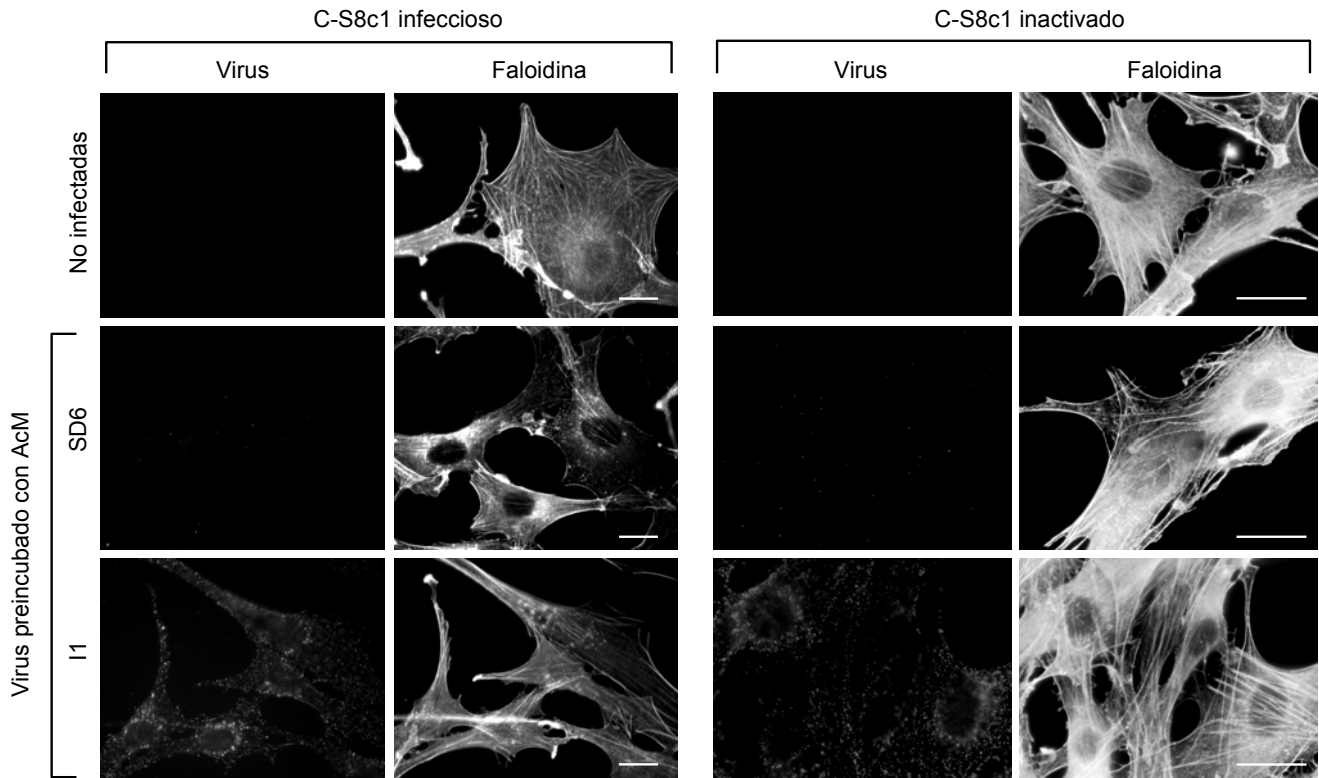


Fig. 31. Inhibición de la unión de VFA inactivado con BEI.

Las partículas de C-S8c1 inactivadas con BEI, o las partículas infecciosas, fueron incubadas con el AcM neutralizante SD6 o con el AcM I1 como control. A continuación, estas partículas fueron adsorbidas sobre células BHK-21 durante 25 min a 37° C (m.d.i. de 100 o equivalente del virus inactivado). Las células fueron fijadas y procesadas para inmunofluorescencia indirecta utilizando el AcM 5C4 y un Ac secundario acoplado a AF555. La tinción de la F-actina con faloidina se muestra como indicativo de la forma celular. Barra: 20 µm.

5.4.3 La internalización de VFA inactivado es dependiente de integrinas

A continuación, se procedió al análisis de la utilización de integrinas celulares como receptor por el virus inactivado con BEI. Mediante ensayos serológicos se había descrito que la inactivación química de los viriones con BEI no afecta a la integridad del bucle G-H de la proteína VP1 (Patil et al., 2002). Para confirmar si esto ocurría también con el aislado C-S8c1 utilizado en esta Tesis Doctoral, partículas inactivadas o partículas infecciosas de este virus

Resultados

(utilizadas como control positivo) se preincubaron con el AcM SD6, cuyo epítipo se localiza en el bucle G-H de VP1 (Mateu et al., 1990) o con el AcM I1 frente a la glicoproteína G de VEV (usado como anticuerpo control). La mezcla se incubó con células BHK-21 durante 25 min (Fig. 31). Mediante inmunofluorescencia se pudieron detectar virus internalizados en las células sólo cuando las partículas infecciosas o inactivadas habían sido preincubadas con el AcM I1. Tanto en el caso de las células control (no incubadas con virus) como en las que fueron adsorbidas con partículas preincubadas con el AcM SD6 no se detectaron partículas virales. Estos resultados confirman que la estructura del bucle G-H se mantiene en las partículas de VFA inactivadas con BEI, permitiendo su unión a la célula y que este proceso se inhibe por el AcM SD6.

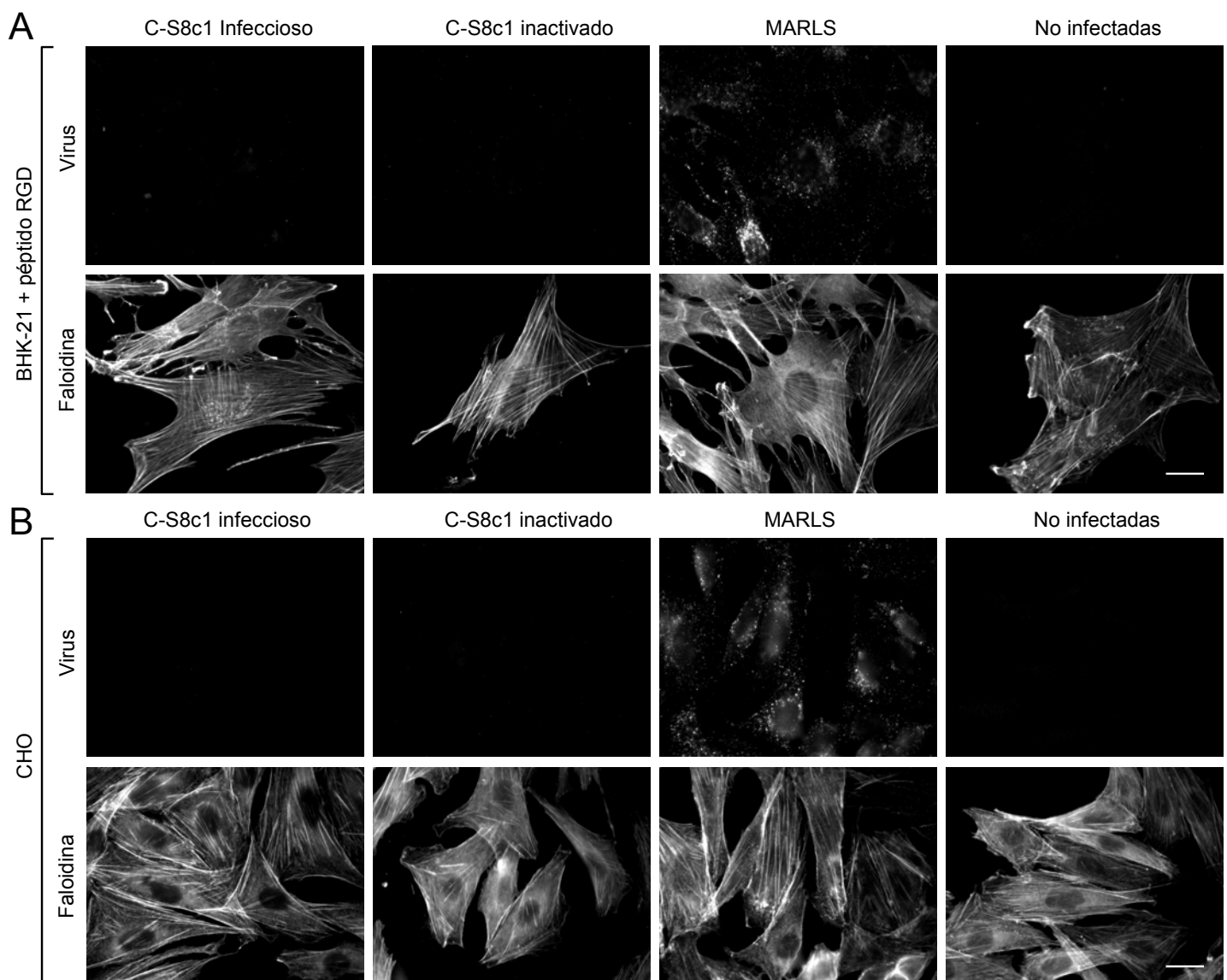


Fig. 32. Las partículas de VFA inactivadas con BEI utilizan integrinas como receptor celular. Ver leyenda en la página siguiente.

Fig. 32. Las partículas de VFA inactivadas con BEI utilizan integrinas como receptor celular.

A) Bloqueo de la adsorción viral con un péptido RGD. Las células BHK-21 fueron preincubadas con un péptido viral que contiene la secuencia RGD de interacción con la integrina celular e incubadas 25 min con los diferentes virus (m.d.i. de 100 o equivalente para VFA inactivado). Tras su fijación, las células fueron procesadas para inmunofluorescencia usando AcM 5C4 y un Ac secundario acoplado a AF555 (apartado 4.19). La tinción de la F-actina con faloidina muestra la forma de las células. Barra: 20 μm .

B) Las partículas de C-S8c1 inactivadas con BEI no son adsorbidas en células CHO. Las células CHO fueron incubadas con los diferentes virus, fijadas y procesadas para inmunofluorescencia en las mismas condiciones que en (A). Barra: 20 μm .

La conservación de la estructura antigénica del epítipo que reconoce el AcM SD6 en las partículas de VFA inactivadas con BEI, sugiere que estas partículas interactúan con integrinas celulares (Fig. 31). Esta posibilidad fue analizada mediante ensayos de bloqueo de la adsorción con un péptido sintético que contiene parte de la secuencia del bucle G-H de VP1 de C-S8c1, incluyendo el motivo RGD de interacción con integrinas celulares. Las células preincubadas con el péptido fueron inoculadas con partículas de VFA inactivadas con BEI, o con virus infeccioso como control. Como se muestra en la Fig. 32A, no se detectaron partículas de VFA en las células tratadas con el péptido sintético e incubadas tanto con el virus inactivado como con virus infeccioso. El único caso en el que se detectaron partículas virales fue en células preincubadas con el péptido e infectadas con el virus MARLS, un derivado de VFA C-S8c1 capaz de utilizar receptores celulares diferentes a las integrinas (Baranowski et al., 1998), utilizado como control.

También se analizó la internalización de partículas de VFA en células CHO (Fig. 32B), que no expresan integrinas utilizadas como receptor por VFA. Las células CHO se incubaron con VFA inactivado o no, y con el variante MARLS. No se detectaron partículas virales mediante inmunofluorescencia en el interior de las células incubadas con el virus C-S8c1 inactivado o con el virus C-S8c1 infeccioso, pero sí en las inoculadas con el mutante MARLS. Estos resultados indican que los virus inactivados con BEI son internalizados en las células susceptibles en forma dependiente de RGD e integrinas, de la misma manera que las partículas infecciosas.

5.4.4 El tratamiento con medio hipertónico inhibe la internalización de VFA inactivado en células susceptibles

El tratamiento con medio hipertónico (conteniendo 0.45 M sacarosa) produce una reducción en el número de fosetas revestidas de clatrina y reduce la internalización y la infección por C-S8c1 (apartado 5.1.1). Puesto que las evidencias disponibles indicaban que el virus C-S8c1 inactivado utiliza integrinas como receptor, de la misma manera que el infeccioso, se evaluó el

Resultados

efecto del tratamiento con medio hipertónico sobre su internalización. Las células tratadas o no con sacarosa fueron incubadas con C-S8c1 inactivado, fijadas y procesadas para inmunofluorescencia (Fig. 33). Mientras que en las células control la fluorescencia debida a las partículas virales se concentró en un patrón punteado perinuclear, en las células tratadas con sacarosa, la fluorescencia se distribuyó a lo largo de la periferia celular. Estos resultados indican que, al igual que ocurre con las partículas infecciosas de VFA, la internalización de las partículas virales inactivadas con BEI es inhibida por el tratamiento con medio hipertónico, sugiriendo que son internalizadas mediante endocitosis dependiente de clatrina.

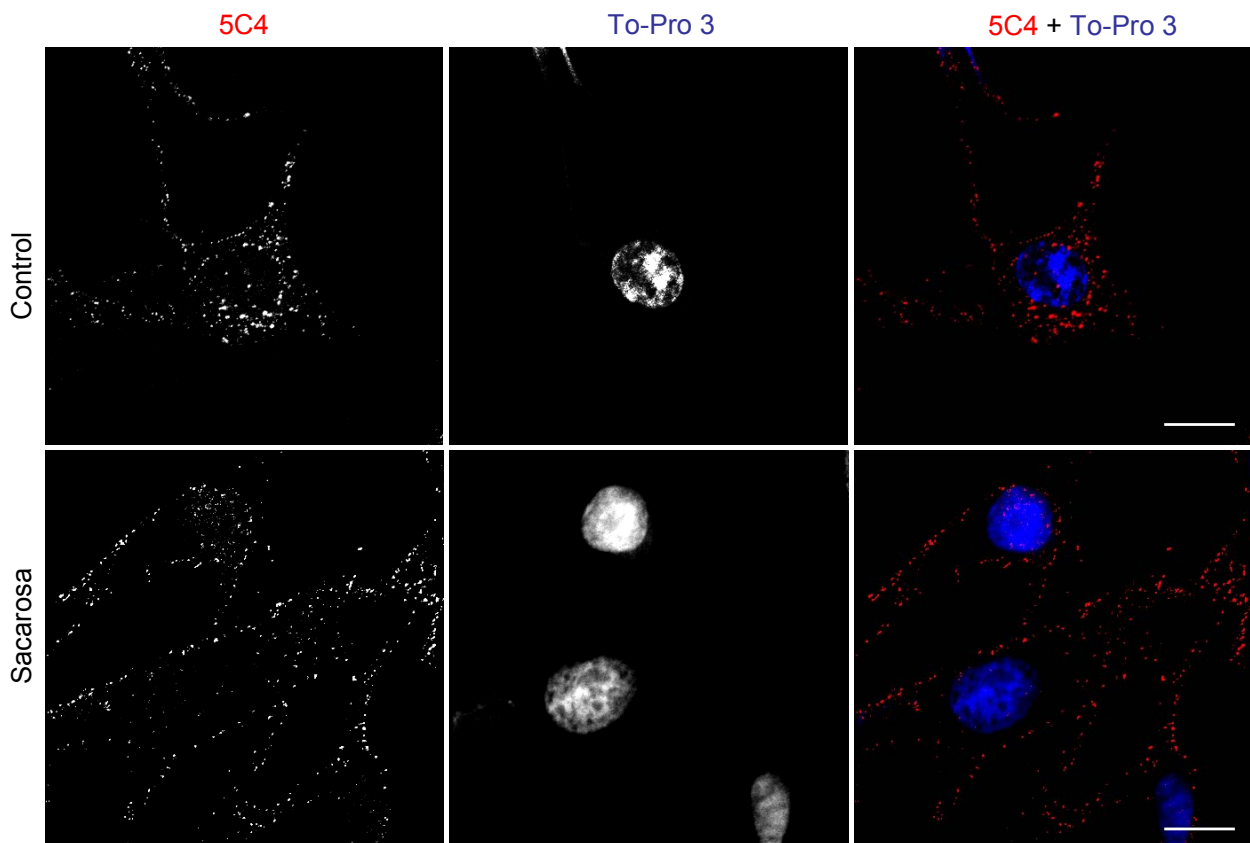


Fig. 33. El medio hipertónico inhibe la entrada de las partículas de VFA inactivadas.

Las células BHK-21, tratadas o no con 0.45 M sacarosa, fueron incubadas con C-S8c1 inactivado con BEI (cantidad equivalente a una m.d.i. de 100) durante 5 ó 25 min y procesadas para inmunofluorescencia con el AcM 5C4 y un Ac secundario acoplado a AF555 (rojo). En azul, la tinción de los núcleos con To-Pro 3. Las imágenes corresponden a secciones ópticas obtenidas a nivel del plano medio de la célula mediante microscopía confocal. Barras: 20µm.

5.5 Ruta de internalización de VEVC: estudio comparativo con VFA y VEV

5.5.1 La infección de VEVC es inhibida por tratamientos que afectan la endocitosis mediada por clatrina

Como parte de esta Tesis Doctoral, se decidió estudiar y comparar la ruta de entrada de VEVC (causante de una enfermedad con signos clínicos indistinguibles de la FA), con la ruta de entrada de VFA, ya que ambos son capaces de crecer en la línea celular IBRS-2. En estos estudios se incluyó también el VEV, causante de una enfermedad con signos clínicos indistinguibles de la FA y modelo de virus que utiliza la endocitosis mediada por clatrina (ver Introducción).

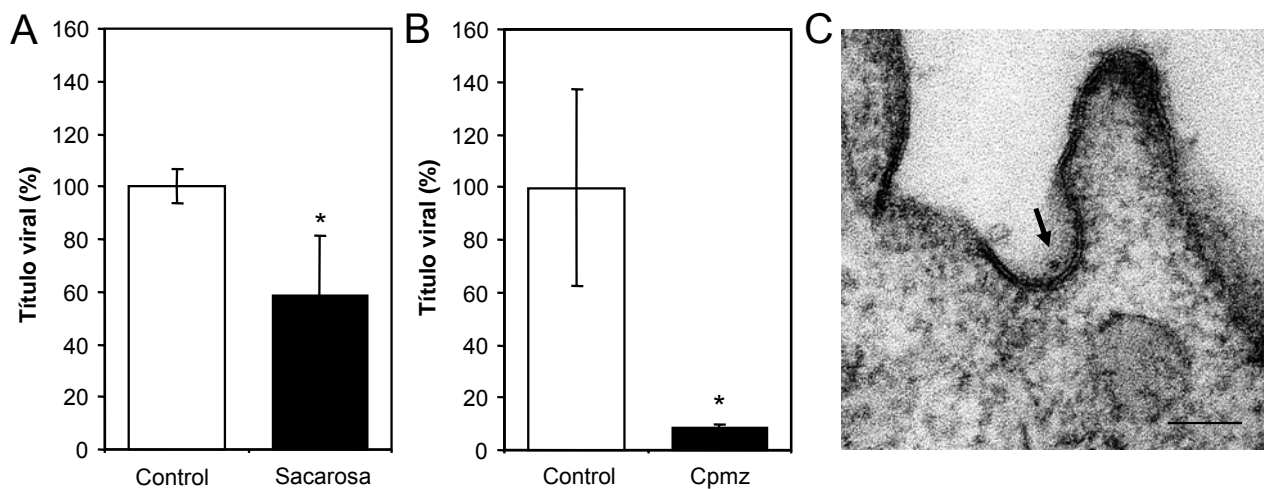


Fig. 34. Papel de las fosetas revestidas de clatrina en la infección de VEVC.

A) El tratamiento con medio hipertónico (0.45 M sacarosa) reduce la infección de VEVC. Las células IBRS-2 tratadas o no con sacarosa fueron infectadas con VEVC (m.d.i. de 0.5) y el título viral fue determinado a las 8 h p.i.

B) El tratamiento con Cpmz inhibe la infección de VEVC. Las células IBRS-2 tratadas o no con Cpmz fueron infectadas con VEVC de la misma manera que en (A).

C) Localización de partículas de VEVC en fosetas revestidas. Microscopía electrónica de las células IBRS-2 incubadas con VEVC (m.d.i. de 300) durante 1 h en hielo y, posteriormente, 5 min a 37° C. La flecha indica una típica estructura electrodensa, compatible con corresponder a una partícula viral. Barra: 100 nm.

Para evaluar el papel de las fosetas revestidas de clatrina en la infección de VEVC, las células IBRS-2 fueron tratadas con medio hipertónico (sacarosa 0.45 M). Este tratamiento redujo el título viral de VEVC en torno al 40% (Fig. 34A). El tratamiento con Cpmz, que interfiere con la formación de fosetas revestidas de clatrina (Wang et al., 1993) e inhibe la endocitosis de virus que utilizan esta ruta (Joki-Korpela et al., 2001; Sun et al., 2005) redujo el título de VEVC en torno a un 90% cuando la Cpmz se añadió preinfección (Fig. 34B); este efecto no fue

Resultados

significativo cuando ésta fue añadida p.i. (datos no mostrados). Cuando la localización de los viriones de VEVC fue estudiada mediante microscopía electrónica, se observaron partículas esféricas en torno a 26 nm de diámetro en fosetas revestidas de clatrina (Fig. 34C). En conjunto, estos resultados sugieren un papel funcional de la clatrina en la internalización de VEVC.

5.5.2 Requerimientos de pH ácido en la infección de VEVC

El posible papel de los endosomas ácidos en la infección de VEVC fue analizado en células IBRS-2. La inhibición de la acidificación endosomal con NH_4Cl produjo una reducción significativa y dependiente de dosis en el título viral alcanzado en células infectadas con VEVC o VFA C-S8c1 (Fig. 35A). Esta reducción fue marcadamente superior en el caso de VEV, para el que no se observó efecto dependiente de dosis, alcanzándose un nivel de inhibición comparable con las dos concentraciones de NH_4Cl empleadas. Cuando el NH_4Cl fue añadido 3 h p.i., no se observó una reducción significativa del título viral, confirmando que el NH_4Cl afecta a una etapa temprana en la infección de VEVC (datos no mostrados).

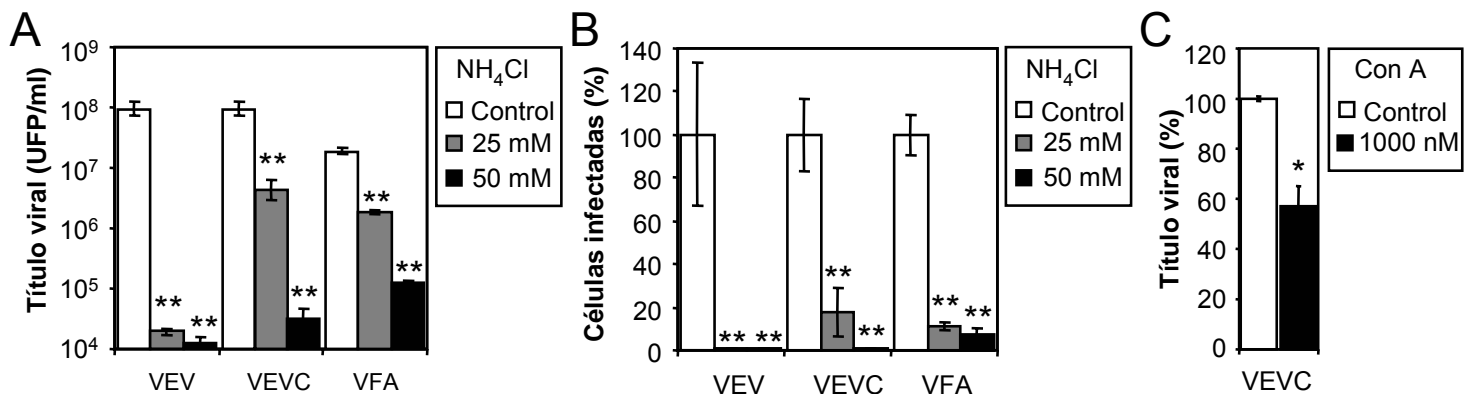


Fig. 35. Papel de los endosomas ácidos en la infección de VEV, VEVC y VFA en células IBRS-2.

A) La inhibición de la acidificación endosomal con NH_4Cl provoca una reducción en el título de VEV, VEVC y VFA. Las células tratadas como se describe en Materiales y Métodos (apartado 4.5) fueron infectadas (m.d.i. de 0.5) y el título viral fue determinado 8 h p.i.

B) El tratamiento con NH_4Cl reduce el porcentaje de células infectadas con VEV, VEVC y VFA. Las células tratadas con distintas concentraciones de NH_4Cl fueron infectadas (m.d.i. de 0.5) y el porcentaje de células infectadas (8 h p.i.) fue determinado mediante inmunofluorescencia con los AcM II, 2H12 y 5C4 para detectar VEV, VEVC y VFA, respectivamente. Se empleó un Ac secundario acoplado a AF488 para la detección de los AcMs.

C) El tratamiento con Con A reduce la infección del VEVC. Las células fueron tratadas con Con A e infectadas con VEVC (m.d.i. de 0.5). El título viral fue determinado 8 h p.i.

El tratamiento con 25 mM NH₄Cl produjo una reducción en torno al 80% en el número de células infectadas por VEVC, y de más del 90% cuando las células fueron tratadas con 50 mM NH₄Cl (Fig. 35B). Se observó una reducción comparable del número de células infectadas por VFA, y mayor en el caso de VEV. La sensibilidad de la infección de VEVC al tratamiento con Con A, un inhibidor de la V-ATPasa que resulta en el bloqueo de la acidificación de los compartimientos endosomales e inhibe la infección por VFA y VEV (Fig. 13), produjo una bajada significativa de título alcanzado por VEVC (Fig. 35C). Esta reducción fue observada cuando la Con A se añadió antes de la infección, no observándose cuando la droga fue añadida 3 h p.i. (datos no mostrados). Estos resultados indican que VEVC depende de la presencia de endosomas ácidos para desarrollar una infección productiva.

Los resultados anteriormente descritos nos llevaron a realizar un seguimiento de las etapas iniciales de la infección de VEVC mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal (Fig. 36). Tras 15 min a 37° C, se observó un patrón punteado en el citoplasma de las células, correspondiente a las partículas de VEVC internalizadas (Fig. 36A). En experimentos de doble marcaje con un anticuerpo frente al marcador de endosomas tempranos EEA1 se observó que el $17 \pm 2\%$ de las vesículas positivas para este marcador colocalizaron con partículas virales (Fig. 36A, círculos). Este porcentaje de endosomas tempranos también positivos para VEVC se redujo con el progreso de la infección (45 min), sugiriendo el tráfico de las partículas virales hacia otros compartimientos celulares (Fig. 36 A y B). Por otra parte, el $18 \pm 6\%$ de las estructuras positivas para TF colocalizó con VEVC tras 15 min a 37° C, mostrando valores similares a los obtenidos para el doble marcaje entre EEA1 y VEVC (Fig. 36C, círculos). Algunas partículas de VEVC se observaron próximas a microtúbulos (Fig. 36C, puntas de flecha), sugiriendo que podrían encontrarse en el interior de vesículas asociadas a este componente del citoesqueleto celular. Todos estos resultados indican que, al igual que lo descrito para VFA y VEV, las partículas de VEVC deben transitar a través de endosomas ácidos para poder desencadenar una infección productiva.

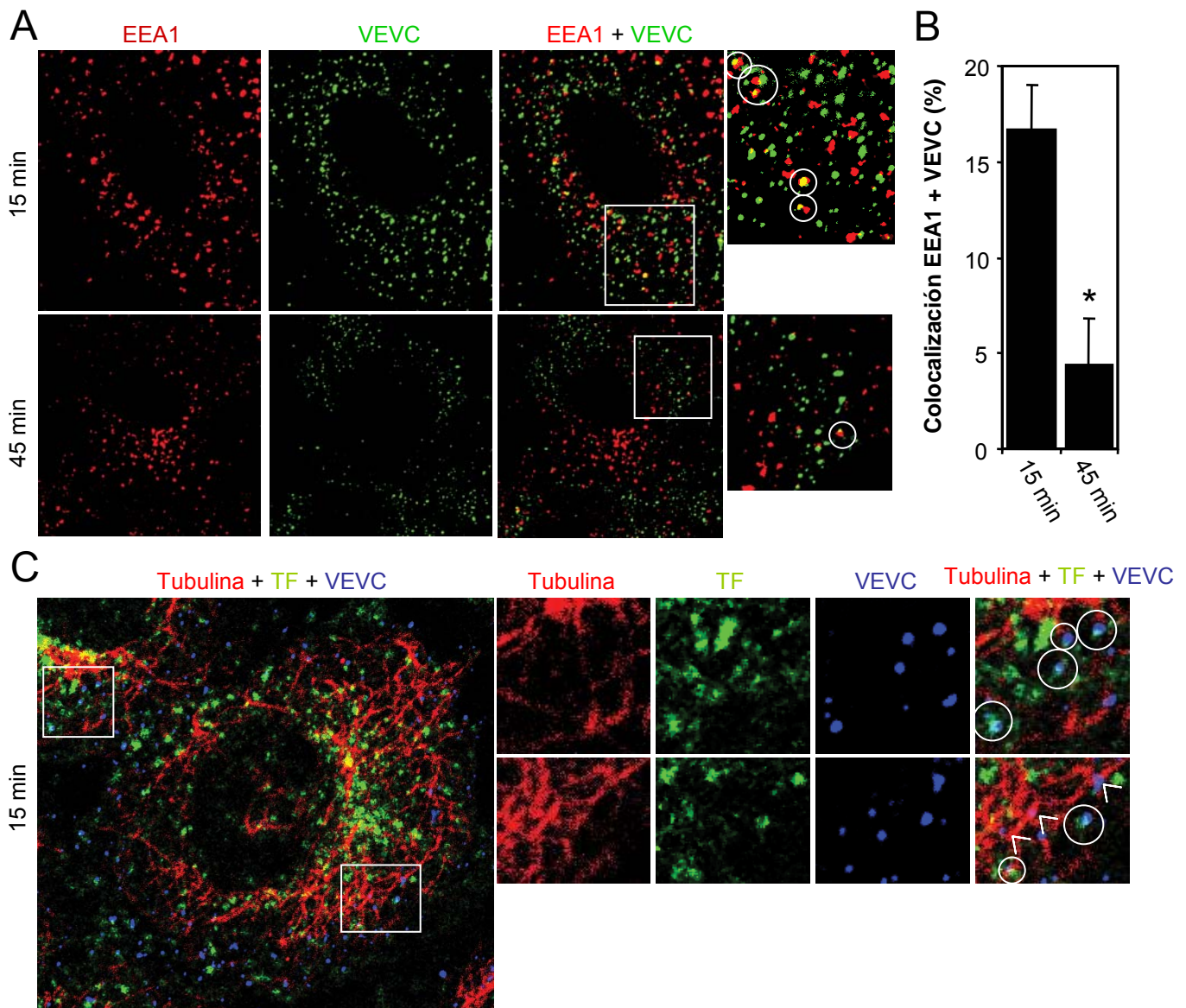


Fig. 36. Colocalización de VEVC con marcadores endosomales.

A) Colocalización de las partículas de VEVC con el marcador de endosomas tempranos EEA1. Las células IBRS-2 fueron incubadas con VEVC (m.d.i. de 100) durante 1 h en hielo y, a continuación a 37° C durante 15 ó 45 min. Las células fueron fijadas y procesadas para inmunofluorescencia usando un AcM anti-EEA1 en combinación con un suero de conejo frente a la proteína VP1 de VEVC. Los Ac secundarios empleados fueron anti-ratón AF594 (rojo) y anti-conejo AF488 (verde). La colocalización entre los dos marcadores se muestra en amarillo (círculos).

B) Cuantificación de la colocalización entre VEVC y EEA1. El porcentaje de vesículas positivas para EEA1 también positivas para VEVC en los experimentos descritos en (A) fue determinado en función del tiempo de incubación a 37° C.

C) Colocalización de VEVC con TF y microtúbulos. Las células infectadas como en (A) en combinación con TF AF488 (verde) fueron fijadas y procesadas para inmunofluorescencia usando un AcP frente a la proteína VP1 del VEVC y un AcM anti-tubulina. Los Ac secundarios fueron anti-ratón AF555 (rojo) y anti-conejo AF647 (azul). La colocalización entre el azul y verde aparece en azul claro (círculos). Las puntas de flecha señalan partículas de VEVC próximas a microtúbulos.

5.5.3 Diferentes requerimientos de componentes del citoesqueleto en la infección con VEV, VEVC y VFA

El transporte de las vesículas intracelulares que contienen las partículas virales internalizadas requiere en algunas ocasiones la función de componentes del citoesqueleto celular como microtúbulos (Greber y Way, 2006). La proximidad de las partículas internalizadas de VEVC a microtúbulos celulares observada mediante microscopía confocal (Fig. 36C, puntas de flecha), nos llevó a evaluar el posible requerimiento de la función de los microtúbulos para la infección de los tres virus comparados. El tratamiento con nocodazol causó una despolimerización de los microtúbulos celulares observada mediante inmunofluorescencia con un AcP frente a la tubulina (Fig. 37A). Cuando el nocodazol se añadió preinfección, redujo el título viral alcanzado por VEVC en un 60% (Fig. 37B), mientras que no afectó a la infección con el aislado de VFA C-S8c1, confirmando los resultados previos descritos para VFA de serotipo O (Berryman et al., 2005). Cuando el nocodazol fue añadido p.i., el título de VEVC no fue reducido, indicando que los microtúbulos juegan un papel importante en una etapa temprana de la infección. Sin embargo, en el caso de VEV, el título fue reducido en una manera similar a cuando el nocodazol fue añadido tanto pre como p.i., indicando que la despolimerización de los microtúbulos también puede afectar algún paso de la replicación de VEV, diferente del transporte de los viriones internalizados. Estos resultados probablemente reflejan la dependencia de la infección de VEV de una vía secretora intacta (Das et al., 2006; Rindler et al., 1984). De hecho, la despolimerización de los microtúbulos con nocodazol indujo la fragmentación del complejo de Golgi (datos no mostrados). Como era de esperar, la adición p.i. del nocodazol, no afectó al título de VFA recuperado.

El posible papel de la integridad del citoesqueleto de actina en la infección viral fue también analizado. El tratamiento con Cit D causó la despolimerización de los microfilamentos de actina (Fig. 37C). Sin embargo, no se observaron efectos significativos sobre el título viral de VEV, VEVC y VFA cuando la Cit D fue añadida pre o p.i. (Fig. 37D). Estos resultados indican que la infección productiva de VEVC y VEV, pero no la de VFA, requiere la integridad de los microtúbulos celulares. Esta dependencia es exclusiva de las etapas tempranas de la infección en el caso de VEVC. Por otro lado, el desensamblaje de los microfilamentos de actina no afecta a la infección de ninguno de los tres virus analizados.

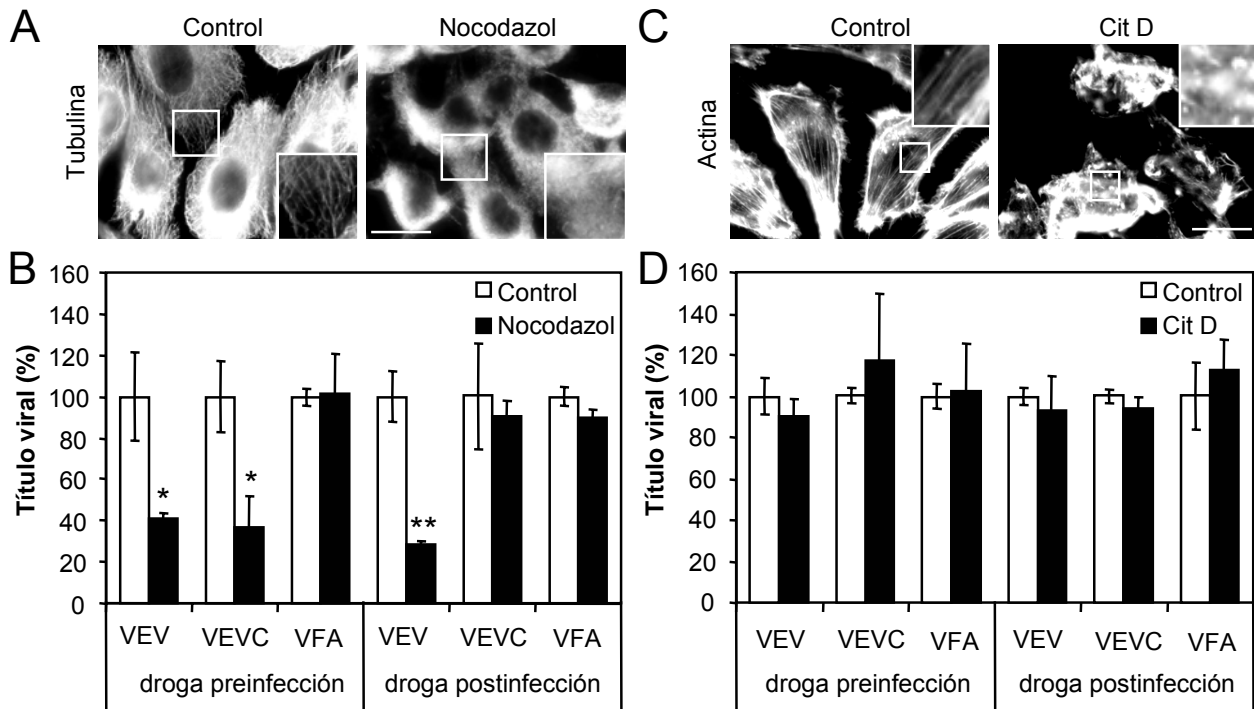


Fig. 37. Requerimiento diferencial de componentes del citoesqueleto para la infección con VEV, VEVC y VFA.

A) El tratamiento con nocodazol causa la despolimerización de los microtúbulos de las células IBRS-2. Las células fueron tratadas con nocodazol, fijadas y procesadas para inmunofluorescencia utilizando un AcP anti-tubulina y un Ac secundario anti-conejo acoplado a AF488. Barra: 20 μ m.

B) Efectos del tratamiento con nocodazol sobre la infección con VEV, VEVC y VFA (C-S8c1). Las células IBRS-2, tratadas o no con nocodazol, fueron infectadas con los virus (m.d.i. de 0.5) y el título viral alcanzado se determinó 8 h p.i.

C) El tratamiento con Cit D causa la despolimerización de los microfilamentos de actina. Las células IBRS-2 tratadas con Cit D fueron fijadas e incubadas con faloidina AF488 para detectar la F-actina.

D) Efectos del tratamiento con Cit D sobre la infección con VEV, VEVC y VFA. Las células, tratadas o no con Cit D, fueron infectadas como en (B).

5.5.4 Diferentes requerimientos de transducción de señales en la infección de VEV, VEVC y VFA

La dinamina es una GTPasa responsable de la fisión de las vesículas implicadas en distintos tipos de endocitosis, incluyendo la ruta dependiente de clatrina (ver Introducción). El tratamiento con dinasora, un inhibidor de la actividad de la dinamina (Macia et al., 2006), redujo significativamente el crecimiento de VEVC y VFA cuando esta droga se añadió preinfección, pero no inhibió el crecimiento de ninguno de estos dos virus cuando ésta fue añadida p.i. (Fig. 38A). Sin embargo, en el caso de VEV, la dinasora inhibió el crecimiento del virus cuando fue añadida pre y p.i. Estos resultados indican que la función de la dinamina se requiere sólo en las etapas tempranas de la infección de VEVC y de VFA, mientras que para VEV, este

requerimiento se extiende a etapas posteriores a la internalización. De hecho, la dinamina también ha sido implicada en la formación de vesículas en el complejo de Golgi (Kessels et al., 2006), afectando así a la vía secretora cuya función es necesaria para la infección de VEV (Das et al., 2006; Rindler et al., 1984).

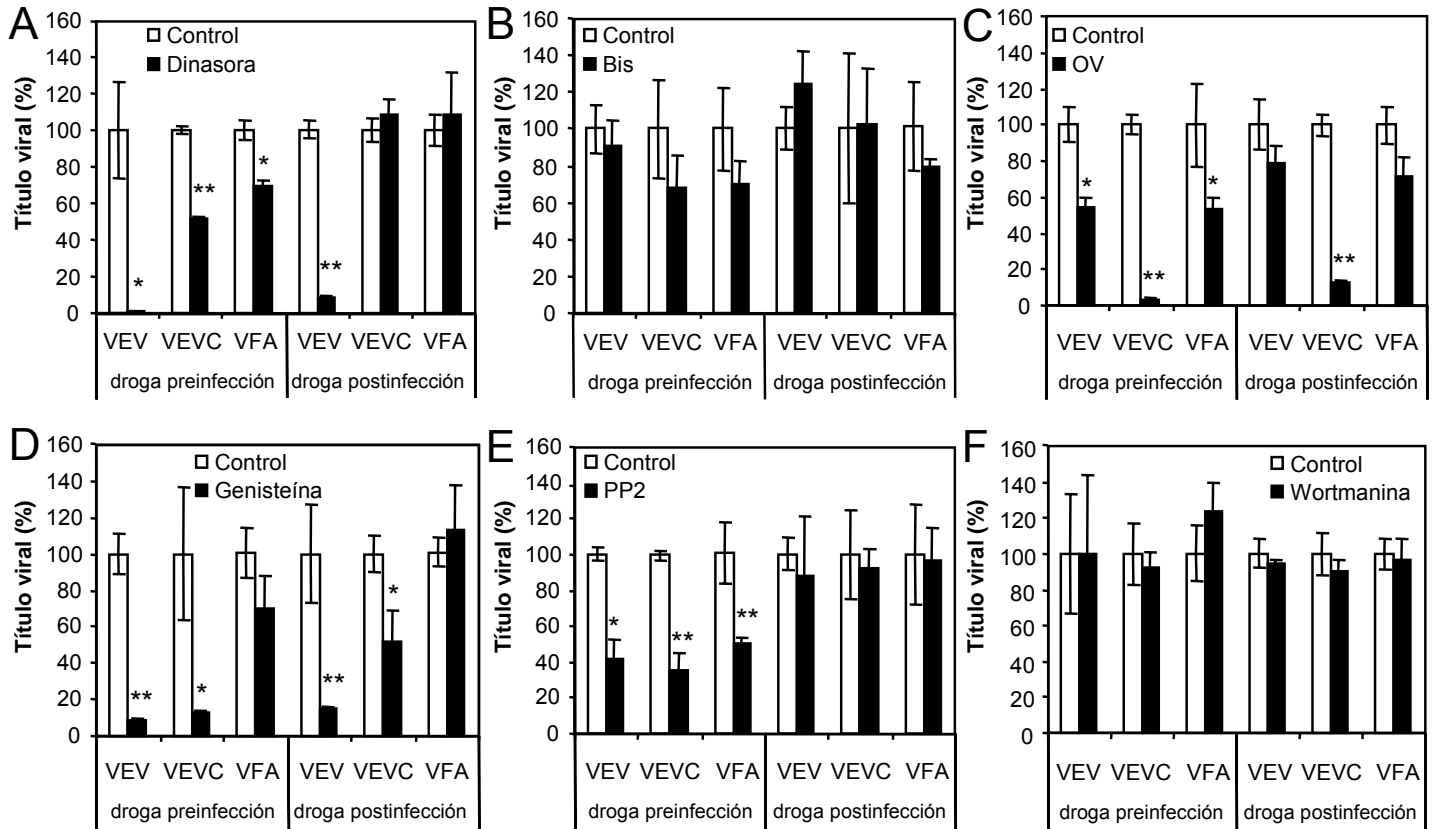


Fig. 38. Requirimientos de dinamina y de maquinaria de señalización celular para la infección de VEV, VEVC y VFA.

Las células IBRS-2 fueron tratadas con los diferentes inhibidores (apartado 4.5) e infectadas con los virus (m.d.i. de 0.5). El título viral recuperado fue determinado 8 h p.i.

A-F) Efecto de los distintos inhibidores añadidos pre y p.i. en la infección con VEV, VEVC y VFA.

La internalización y el tráfico intracelular de las vesículas endocíticas están gobernados por complejos fenómenos de señalización celular, que incluyen multitud de quinasas y fosfatasa celulares (ver Introducción). El tratamiento con Bis, un inhibidor de la actividad de PKC, no tuvo efectos significativos sobre la infección de los tres virus analizados (Fig. 38B). Sin embargo, el tratamiento con OV, un inhibidor de fosfatasa de tirosina, produjo una reducción de la infección del VEVC cuando se añadió tanto pre como p.i. (Fig. 38C). En el caso de VFA y VEV, el tratamiento con OV sólo redujo significativamente el título viral cuando fue añadido

preinfección, pero no cuando se añadió p.i. Estos resultados sugieren que el OV afecta sólo a las etapas tempranas de la infección de VEV y VFA, pero también afecta a etapas tardías de la infección de VEVC. El tratamiento con genisteína, un inhibidor de quinasas de tirosina, redujo los títulos de VEVC y VEV, pero no el de VFA, cuando la droga fue añadida tanto pre como p.i. (Fig. 38D), indicando que el efecto inhibitorio de este fármaco no es específico de las etapas tempranas de la infección. Por otro lado, el tratamiento con PP2, un inhibidor específico de quinasas de tirosina de la familia Src, redujo los títulos de VEVC, VFA y VEV cuando se añadió preinfección, pero no cuando fue añadido p.i., sugiriendo que estas quinasas están implicadas en las etapas tempranas de la infección (Fig. 38E). Asimismo, el tratamiento con wortmanina, un inhibidor de la fosfatidil-inositol-3-quinasa (PI3K), no tuvo efectos significativos sobre la infección de ninguno de los tres virus (Fig. 38F), confirmando lo previamente descrito por otros autores para VFA y VEV (Berryman et al., 2005; Le Blanc et al., 2005). En conjunto, estos resultados indican diferentes requerimientos de maquinaria de señalización celular tanto a nivel de las etapas tempranas de la infección, como a nivel de la replicación de VEV, VEVC y VFA.

5.5.5 Diferentes requerimientos de colesterol para la infección con VEV, VEVC y VFA

El colesterol de la membrana plasmática es importante para la funcionalidad de los *lipid-rafts* y la formación de caveolas (apartado 2.2.2), aunque también está implicado en la endocitosis mediada por clatrina (Rodal et al., 1999; Subtil et al., 1999). La extracción de colesterol de la membrana plasmática mediante el tratamiento con M β CD inhibe la endocitosis de virus que son internalizados mediante *lipid-rafts/caveolas* (Coyne y Bergelson, 2006) y puede afectar también a la internalización de virus mediada por clatrina (Snyers et al., 2003; Vela et al., 2007). Además, el colesterol juega un papel importante en la penetración de algunos virus desde los endosomas (Danthi y Chow, 2004; Imelli et al., 2004). Para evaluar el papel del colesterol en las etapas tempranas de la infección de los tres virus comparados, las células IBRS-2 fueron tratadas con M β CD. Mediante tinción del colesterol celular con filipina se pudo observar que el tratamiento con M β CD redujo la intensidad de la fluorescencia debida al colesterol de la membrana plasmática, dejando el contenido de colesterol intracelular intacto (Fig. 39A). El tratamiento con M β CD afectó diferencialmente a la infección con VEVC, VFA y VEV (Fig. 39B). Mientras que el título de VEV no fue reducido significativamente, los títulos de VEVC y VFA se vieron reducidos un 80% y un 25%, respectivamente, cuando la M β CD se añadió preinfección, pero no cuando se añadió p.i., indicando que el colesterol es necesario durante una etapa temprana de la infección. El tratamiento con α CD, una ciclodextrina que no extrae colesterol de la membrana plasmática (Shvartsman et al., 2006), no tuvo efectos significativos

sobre la infección de los tres virus analizados, confirmando que el efecto inhibitorio de la M β CD sobre VEV y VFA se debe a la extracción de colesterol y no a otros factores derivados del tratamiento con una ciclodextrina (datos no mostrados).

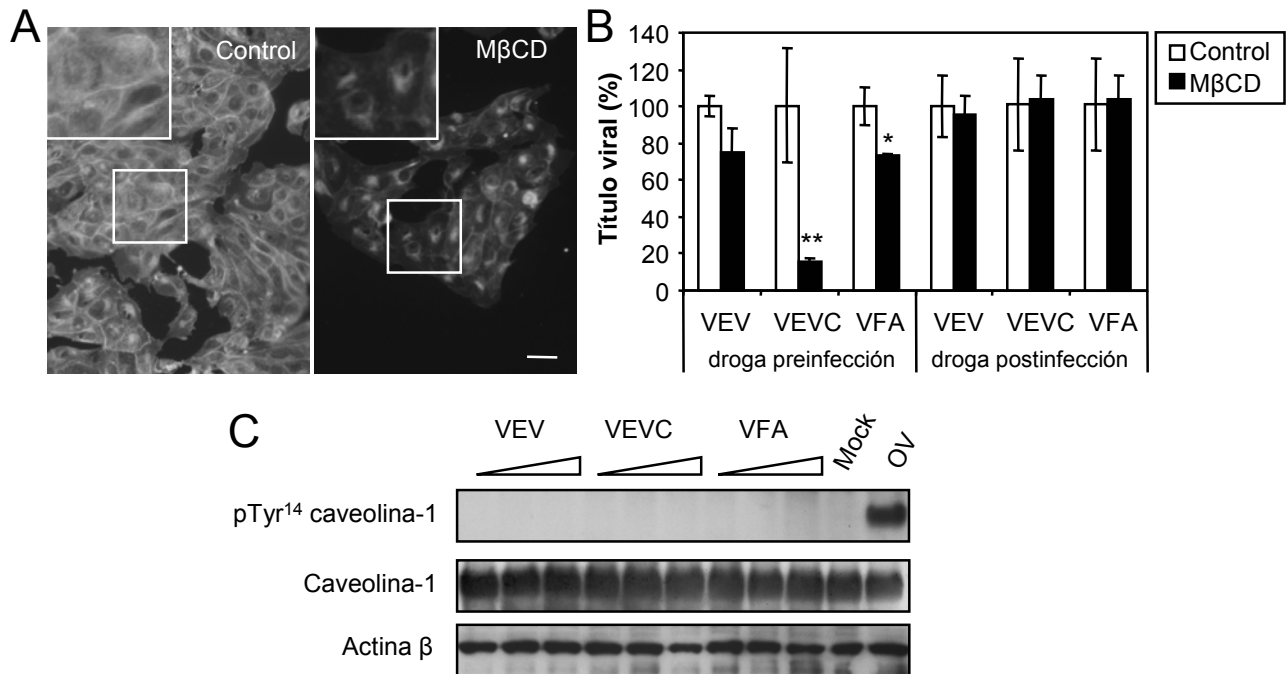


Fig. 39. Requerimiento diferencial de colesterol para la infección con VEV, VEVC y VFA en células IBRS-2.

A) El tratamiento con M β CD reduce el contenido de colesterol de la membrana plasmática sin afectar el contenido intracelular. Las células, tratadas o no con M β CD, fueron teñidas con filipina y examinadas mediante microscopía de fluorescencia. Barra: 20 μ m.

B) Efectos del tratamiento con M β CD sobre la infección de VEV, VEVC y VFA. Las células, tratadas o no con M β CD, fueron infectadas con los virus (m.d.i. de 0.5) y el título viral alcanzado se determinó 8 h p.i.

C) La infección con VEV, VEVC y VFA no induce la fosforilación de la caveolina-1 en la Tyr 14. Las células fueron incubadas en hielo durante 1 h con los diferentes virus (m.d.i. de 100) y transferidas a 37° C durante 15, 30 o 60 min. A continuación fueron lisadas y procesadas para *western blot* utilizando un AcM fosfoespecífico dirigido frente a la caveolina fosforilada en la Tyr 14, o un suero frente a la caveolina para detectar la caveolina total. Un extracto de células tratadas con OV durante 60 min se incluyó como control positivo del funcionamiento del anticuerpo fosfoespecífico. Las membranas fueron reincubadas también con un AcM anti-actina β como control de carga.

La M β CD puede inhibir la infección de virus internalizados a través de *lipid-rafts/caveolas*. Por ello, se analizó la capacidad de los virus estudiados de inducir la fosforilación de la caveolina-1 en la Tyr 14, evento esencial para la endocitosis mediada por caveolas del CVB3 (Coyne y Bergelson, 2006) y para la internalización de caveolas (del Pozo et al., 2005) (Fig. 39C). Ninguno de los tres virus indujo la fosforilación de la caveolina-1 en este residuo. La única señal positiva fue obtenida en las células tratadas con OV, que origina la fosforilación de la caveolina-1 (Shin et al., 2006), usado como control positivo. Además, los tratamientos con nistatina, filipina o lovastatina, que inhiben la endocitosis dependiente de *lipid-rafts/caveolas* (Coyne y Bergelson, 2006; Triantafilou y Triantafilou, 2004), no inhibieron la infección de ninguno de los tres virus analizados (datos no mostrados). Estos resultados indican que el requerimiento de colesterol para la infección de VEVC y VFA es independiente de la formación de caveolas.

5.6 Complejo de replicación de VEVC: estudio comparativo con VFA y VEV

5.6.1 Caracterización del complejo de replicación de VEVC

A diferencia de lo que ocurre con VFA y VEV (ver Introducción), existe un reducido número de estudios sobre la distribución subcelular de las proteínas de VEVC y la organización de su complejo de replicación. Existen anticuerpos frente a las proteínas de la cápsida de VEVC (Borrego et al., 2002a; Jiménez-Clavero et al., 2001) y, asimismo, se dispuso de anticuerpos frente a las proteínas no estructurales 2C, 2BC y 3A del enterovirus CVB3 (Cornell et al., 2006), que permiten detectar las proteínas homólogas de VEVC. Con estas herramientas se llevó a cabo el análisis de la localización celular de estas proteínas mediante inmunofluorescencia indirecta y microscopía confocal (Fig. 40).

Primero se realizaron infecciones con VEVC a baja m.d.i. (0.5 UFP/célula) en las que se observaron células con diferente progresión del efecto citopático. Para los análisis llevados a cabo se seleccionaron células con bajo efecto citopático (determinado mediante observación en contraste de fases), ya que la progresión de la infección origina alteraciones morfológicas en la célula que dificultan este tipo de estudio. La fluorescencia resultante del marcaje con los anticuerpos frente a las proteínas no estructurales 2C, 2BC y 3A se localizó en cúmulos perinucleares, mostrando también un patrón citoplasmático punteado más disperso. El patrón correspondiente a las proteínas no estructurales colocalizó con la tinción obtenida con el AcM 2H12 frente a la proteína VP1 de VEVC. Dado que el AcM 2H12 reconoce un epítipo conformacional, que sólo está presente en cápsidas maduras (Borrego et al., 2002a), estos resultados indican que el ensamblaje de las cápsidas de VEVC tiene lugar muy cerca del

complejo de replicación, de la misma manera que lo descrito para otros enterovirus (Egger et al., 2000; Krogerus et al., 2003).

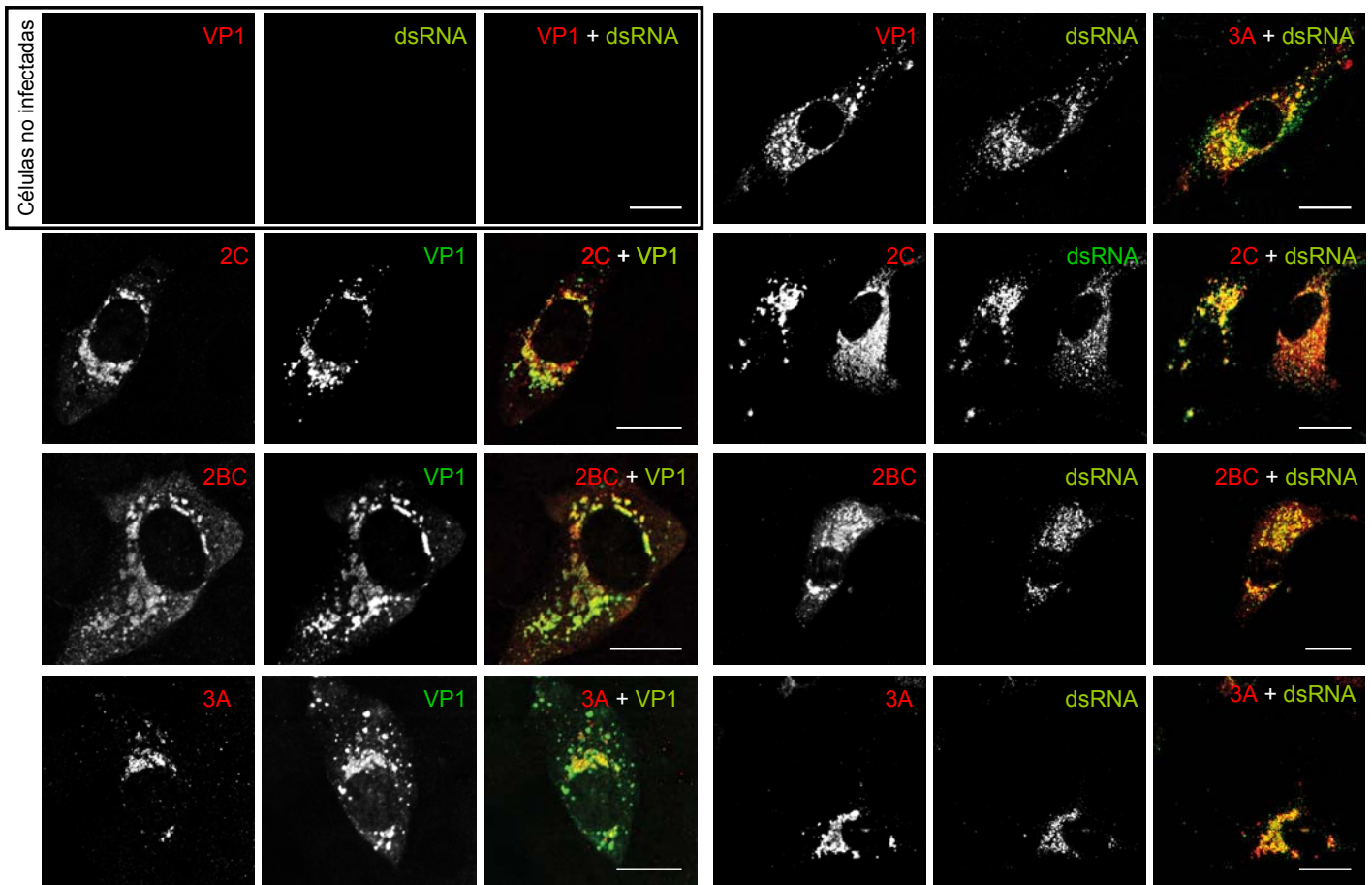


Fig. 40. Caracterización del complejo de replicación de VEVC.

Las células IBRS-2 fueron infectadas con VEVC (m.d.i. de 0.5), fijadas 8 h p.i. y procesadas para inmunofluorescencia y microscopía confocal. Los AcP utilizados fueron anti-2C, anti-2BC y anti-3A de CVB3, combinados con el AcM 2H12 frente a la proteína VP1 de VEVC o el AcM J2 frente a ARN de doble cadena (dsRNA). También se realizó un doble marcaje frente a VP1 y dsRNA, combinando un AcP frente a VP1 con el AcM J2. Los Ac secundarios utilizados fueron anti-conejo AF594 (rojo) y anti-ratón AF488 (verde). La colocalización entre ambos marcadores se observa en amarillo en las imágenes en color.

La acumulación de intermedios replicativos de RNA de doble cadena (dsRNA) en las zonas correspondientes al complejo de replicación de picornavirus ha sido previamente descrita (Gazina et al., 2002). Se realizaron experimentos de doble marcaje utilizando el AcM J2, que reconoce dsRNA, en combinación con anticuerpos frente a las proteínas VP1, 2C, 2BC y 3A. El AcM J2 mostró un patrón punteado por el citoplasma de la célula, compatible con la formación de vesículas citoplasmáticas y similar al descrito para otros picornavirus (Gazina et al., 2002). La fluorescencia frente a dsRNA colocalizó con las proteínas estructurales y no estructurales de

Resultados

VEVC. Estos resultados confirman que la replicación y el ensamblaje de los viriones de VEVC tienen lugar acoplados en el citoplasma de la célula infectada.

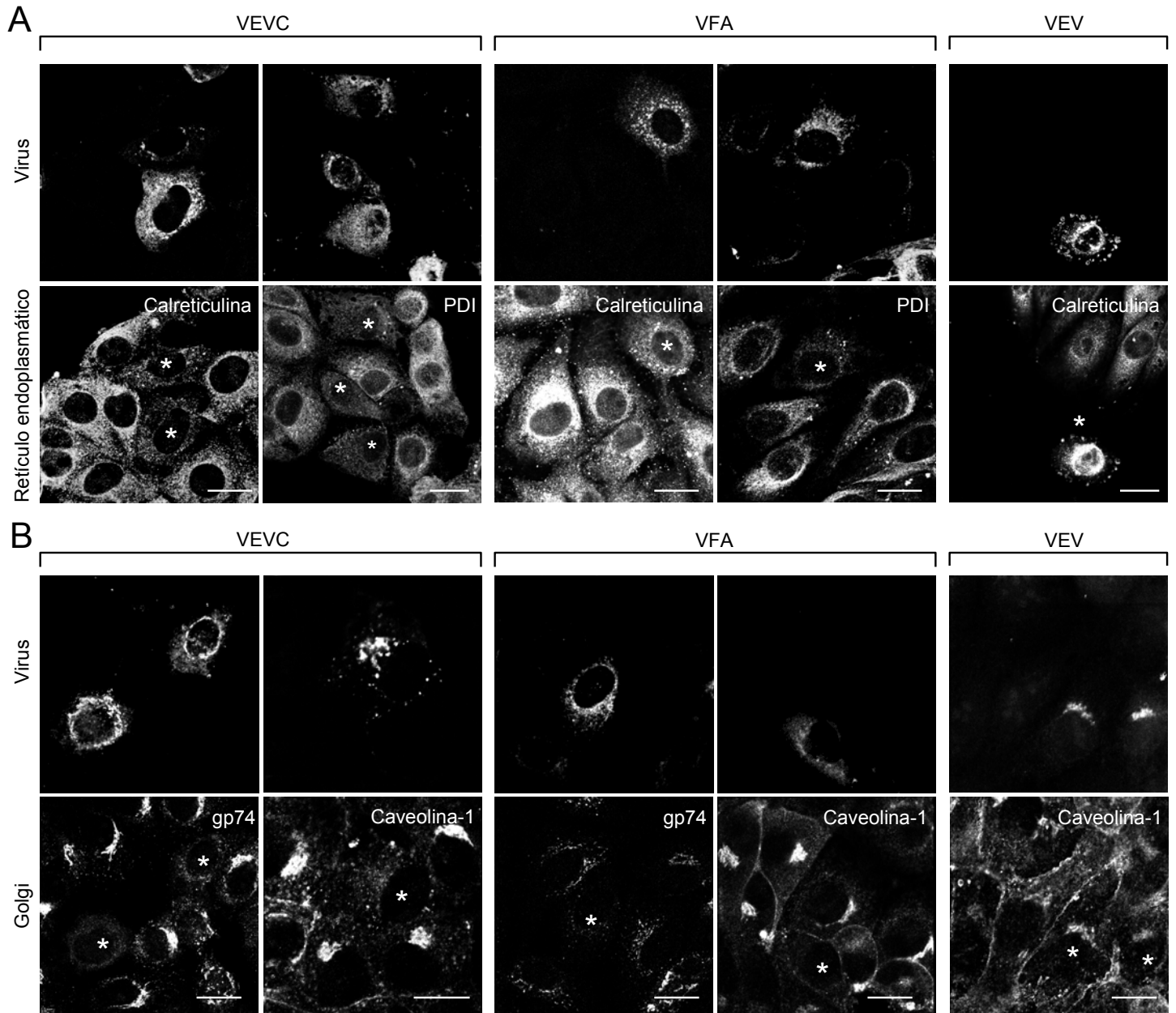


Fig. 41. Efectos de la infección con VEV, VEVC y VFA sobre el retículo endoplasmático y el complejo de Golgi.

A) Efectos de la infección sobre la localización celular de los marcadores de retículo. Las células IBRS-2 fueron infectadas (m.d.i. de 0.5), fijadas 8 h p.i. y procesadas para inmunofluorescencia y microscopía confocal utilizando un AcP de conejo frente a la calreticulina o el AcM 1D3 frente a PDI. Las proteínas virales fueron detectadas con los AcM 2H12 (VEVC), SD6 (VFA) e I1 (VEV) o los AcP anti-VP1 de VFA y VEVC.

B) Efectos de la infección sobre la localización celular de los marcadores del complejo de Golgi. Las células fueron infectadas, fijadas y procesadas como en (A). Los anticuerpos empleados fueron el AcM 25H8 frente a la proteína gp74 o el AcP frente a la caveolina-1, combinados con los Ac específicos frente a proteínas virales descritos en (A).

5.6.2 Efectos de la infección sobre el retículo endoplasmático y el complejo de Golgi

Dado que la replicación de los picornavirus tiene lugar asociada a membranas intracelulares (ver Introducción), se estudiaron los efectos de la infección de VEVC sobre el retículo endoplasmático y el complejo de Golgi, comparándose con los inducidos por VFA y VEV. De la misma manera que en el apartado anterior, las células IBRS-2 infectadas con claras alteraciones morfológicas resultantes del efecto citopático avanzado no fueron consideradas en este análisis. El análisis mediante microscopía confocal utilizando anticuerpos frente a marcadores del retículo endoplasmático (calreticulina y PDI) mostró una bajada en la intensidad de ambos marcadores en las células infectadas, respecto a las células no infectadas, negativas para el marcaje frente a proteínas virales (Fig. 41A). El mismo efecto fue observado en las células infectadas con VFA. Sin embargo, en las células infectadas con VEV, el patrón de tinción de la calreticulina apareció concentrado perinuclearmente y colocalizó con la glicoproteína G de VEV. La infección con VEVC produjo también una dispersión del marcador de *cis*-Golgi gp74, que en las células no infectadas se localiza perinuclearmente (Fig. 41B). Esta alteración fue también observada en las células IBRS-2 infectadas con VFA. Cuando se realizaron inmunofluorescencias dobles frente a las proteínas virales y la caveolina-1, -una proteína que cicla entre el *trans*-Golgi y la membrana plasmática (Kurzchalia et al., 1994)-, se observó que el marcaje perinuclear de caveolina-1 (correspondiente al complejo de Golgi) estaba dispersado en las células infectadas con VEVC y VFA, pero no en las infectadas con VEV (Fig. 41B). Estos resultados confirman que la infección de VEVC, al igual que la de VFA, origina una dispersión de los marcadores de retículo y Golgi, no observada en las células infectadas con VEV.

5.6.3 Microscopía electrónica en células infectadas con VEVC

Las alteraciones en el retículo endoplasmático y el complejo de Golgi inferidas del análisis mediante microscopía confocal fueron estudiadas mediante microscopía electrónica de transmisión. En este caso se realizaron infecciones a alta m.d.i. (40 UFP/célula) para asegurar que todas las células IBRS-2 estuviesen infectadas. Las monocapas fueron fijadas y procesadas 8 h p.i., cuando la mayor parte de las células presentaba signos apreciables de efecto citopático. A este tiempo de infección se pudieron diferenciar dos poblaciones de células infectadas con VEVC. La primera población estaba compuesta por células con bajo efecto citopático, que aún conservaban la morfología poligonal característica de las células IBRS-2 (Fig. 42). La segunda población englobaba a las células redondeadas que presentaban claros signos de efecto citopático (Fig. 43). En las células que presentaban bajo efecto citopático (Fig. 42), todavía se pudieron identificar tanto el retículo endoplasmático como el complejo de Golgi. En este estadio de

Resultados

infección, las células presentaron un patrón fragmentado de las cisternas del retículo endoplasmático con el lumen expandido (Fig. 42, triángulos blancos), así como abundantes vesículas de gran diámetro asociadas al complejo de Golgi (Fig. 42 flecha), que no se apreció en células control no infectadas.

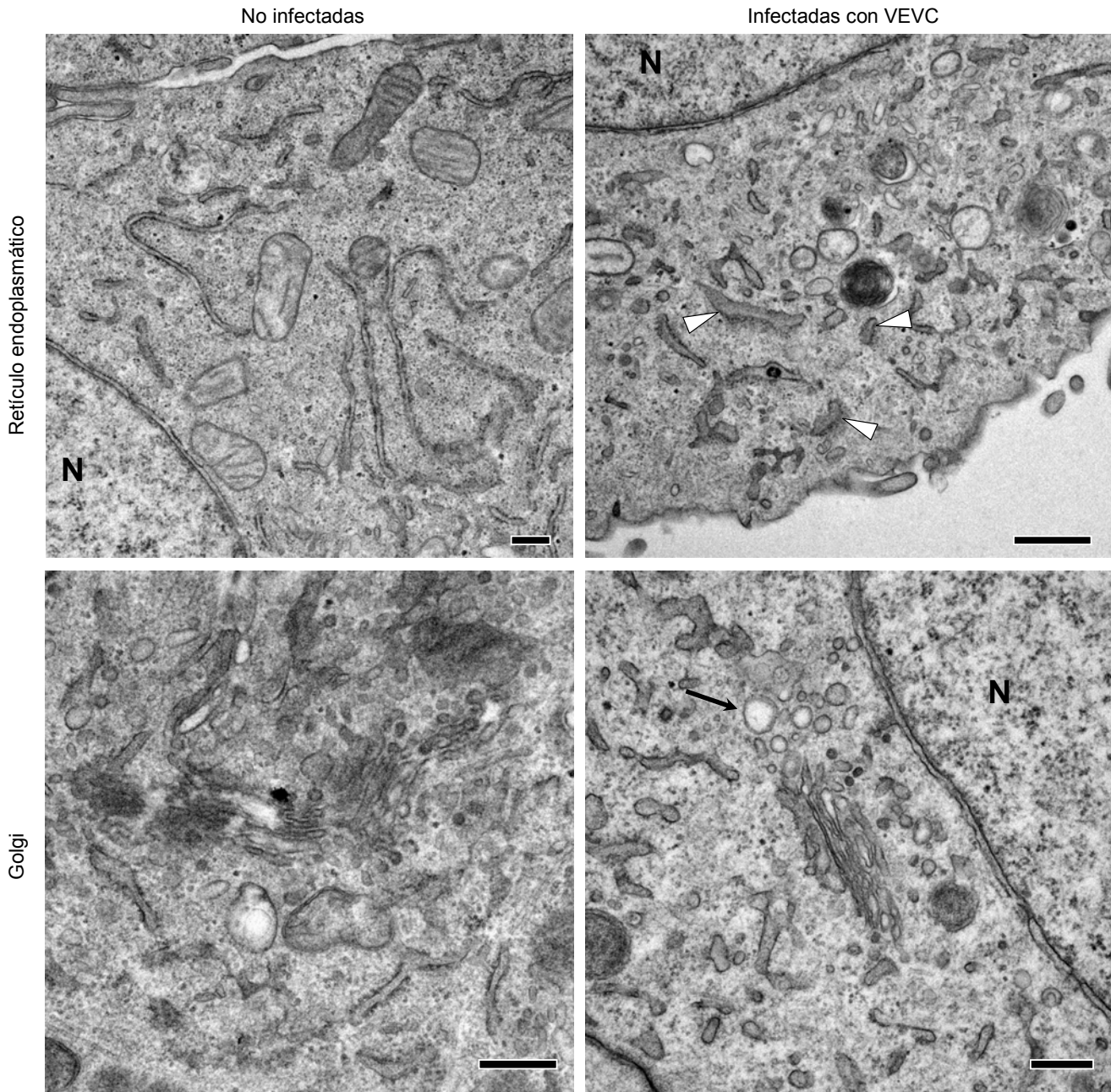


Fig. 42. Microscopía electrónica de células infectadas con VEV: alteraciones en el complejo de Golgi y el retículo endoplasmático.

Las células IBRS-2, infectadas o no con VEV (m.d.i. de 40), fueron fijadas y procesadas para microscopía electrónica. Los triángulos blancos señalan cisternas del retículo endoplasmático con el lumen expandido. La flecha negra indica acúmulos de vesículas cerca del complejo de Golgi. Barras: 100 nm.

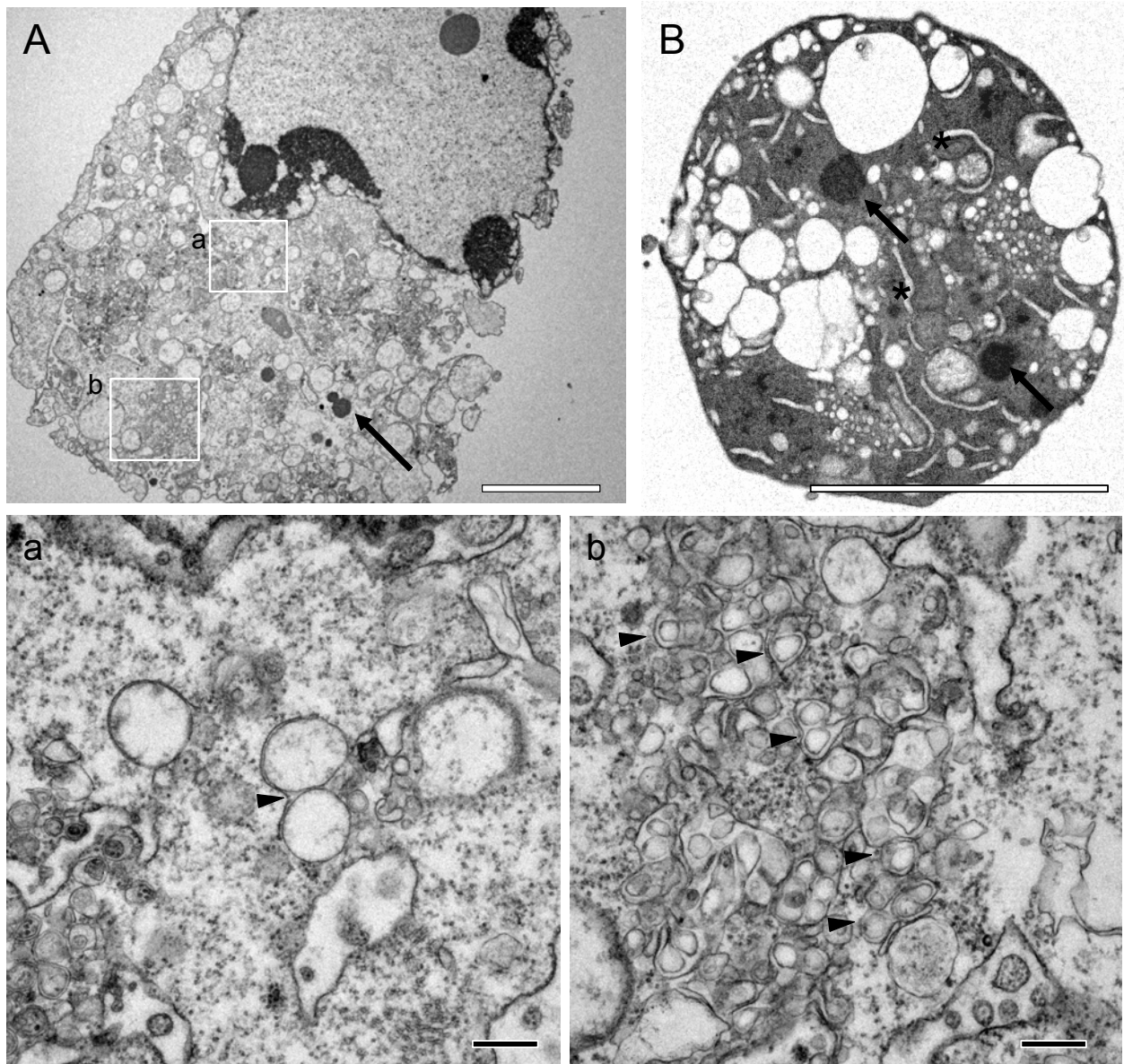


Fig. 43. Microscopía electrónica de células infectadas con VEV: proliferación de vesículas intracelulares.

Las células IBRS-2 infectadas con VEV (m.d.i. de 40), fueron fijadas y procesadas para microscopía electrónica.

A) Imagen de una célula infectada con VEV que presenta un avanzado efecto citopático. La flecha señala inclusiones citoplasmáticas electrodensas. **(a)** y **(b)** corresponden a las regiones ampliadas de **(A)**, y muestran diferentes poblaciones de vesículas encontradas. Los triángulos negros señalan vesículas con doble membrana.

B) Imagen de una célula infectada con VEV que presenta un avanzado efecto citopático. Los asteriscos indican cisternas aplanadas.

Barras blancas: 5 μ m. Barras negras: 100 nm.

Las células con un elevado efecto citopático, presumiblemente correspondientes a estadios más avanzados de la infección, presentaron un citoplasma completamente lleno de vesículas redondeadas, que impidió el reconocimiento de cualquier vestigio del complejo de Golgi o del

Resultados

retículo endoplasmático (Fig. 43 A y B). Dentro de estas células, se pudieron distinguir dos poblaciones de vesículas. La primera población incluiría vesículas con más de 100 nm de diámetro (Fig. 43a). La segunda población comprendería aquellas vesículas más pequeñas, que aparecían abigarradas formando agrupaciones compactas (Fig. 43b). En ambas poblaciones se identificaron vesículas de doble membrana, indicadas mediante triángulos negros en la Fig. 43 a y b, siendo más frecuentes en las asociaciones de vesículas pequeñas. En algunos casos, las células con efecto citopático muy avanzado (Fig. 43B) mostraron un citoplasma completamente lleno de vesículas, incluyendo también largas cisternas (asteriscos). Alguno de los núcleos apareció desorganizado, sugiriendo que la infección de VEVC puede inducir apoptosis, como se ha descrito para otros enterovirus, incluyendo coxsackievirus (Autret et al., 2008; Zaragoza et al., 2006). De esta manera, las inclusiones electrodensas circulares observadas (Fig. 43 A y B, flechas) probablemente correspondan a fragmentos de núcleos apoptóticos y no a cúmulos de material viral. La aparición de figuras apoptóticas nucleares en las células IBRS-2 infectadas con VEVC que manifestaban signos evidentes de efecto citopático fue confirmada mediante microscopía confocal (datos no mostrados). Todos estos resultados indican que la progresión de la infección con VEVC origina reorganizaciones importantes dentro del sistema de endomembranas celulares, produciendo la proliferación de vesículas intracelulares, de las que una gran proporción corresponde a vesículas de doble membrana.

5.6.4 Sensibilidad diferencial a brefeldina A de la infección con VEV, VEVC y VFA

La brefeldina A (BFA) es un compuesto que afecta el tráfico vesicular entre el retículo endoplasmático y el complejo de Golgi. El tratamiento con BFA afecta de manera diferencial a la replicación de los picornavirus (Gazina et al., 2002; Maynell et al., 1992; Monaghan et al., 2004; O'Donnell et al., 2001; Pietiäinen et al., 2004). De acuerdo a lo descrito para células NRK (Alcalde et al., 1994), el tratamiento con BFA causó una rápida dispersión de la proteína marcadora de *cis*-Golgi gp74 en las células IBRS-2 (Fig. 44A), poniendo de manifiesto el desensamblaje del complejo de Golgi. La infección de VEV es muy sensible a BFA, puesto que es dependiente de la función de la vía secretora (de Silva et al., 1990; Irurzun et al., 1993; Oda et al., 1990). De hecho, el tratamiento con BFA de células IBRS-2 produjo una reducción significativa del título viral alcanzado tras su infección con VEV (Fig. 44B), que correlacionó con una disminución importante (90%) de las células infectadas en las que se detectó antígeno viral (Fig. 44C). La BFA redujo en mayor medida el título de VEVC (Fig. 44B) no permitiendo la detección de células positivas para antígenos virales (Fig. 44C). Por el contrario, el tratamiento con BFA no afectó a la infección de VFA (Fig. 44 B y C), como había sido ya descrito

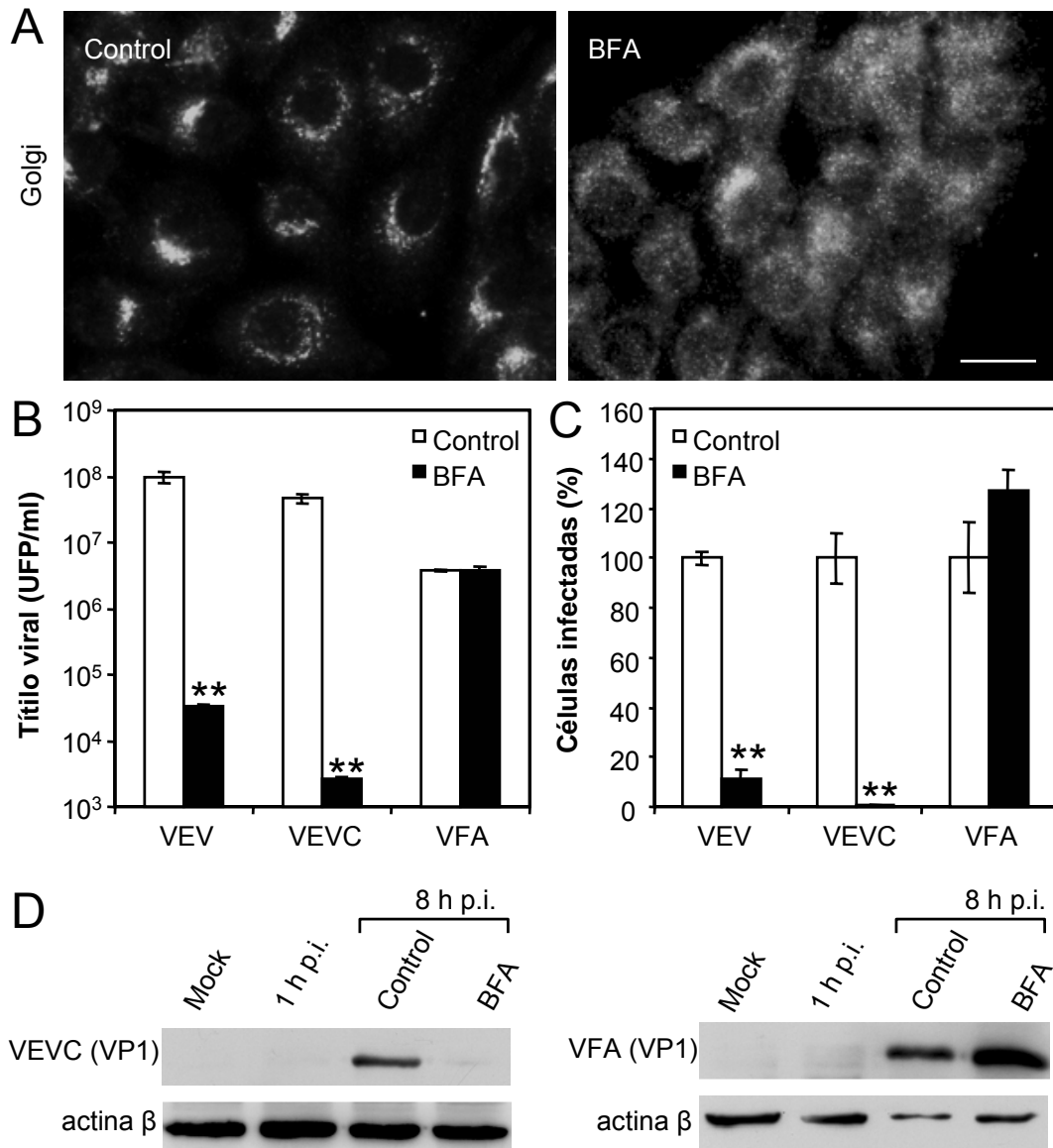


Fig. 44. Efectos del tratamiento con BFA sobre la infección de VEV, VEVC y VFA.

A) El tratamiento con BFA provoca una dispersión de la proteína gp74, marcadora del complejo de Golgi. Las células IBRS-2 fueron tratadas 30 min con BFA, fijadas y procesadas para inmunofluorescencia con el AcM frente a gp74 y un Ac secundario acoplado a AF594.

B) Efecto del tratamiento con BFA sobre el título de VEV, VEVC y VFA. Las células, tratadas o no con BFA, fueron infectadas (m.d.i. de 0.5) y el título viral fue determinado 8 h p.i.

C) Efecto de la BFA sobre el número de células infectadas con el VEV, VEVC y VFA. Las células infectadas como en (A) fueron fijadas y procesadas para inmunofluorescencia utilizando los AcM 2H12, SD6 e I1 y un Ac secundario anti-ratón acoplado a AF488.

D) Efecto de la BFA sobre la síntesis de proteínas virales. Las células infectadas como en (A) con el VEVC o VFA fueron lisadas 8 h p.i. La cantidad de proteína VP1 se estimó mediante *western blot* utilizando el suero de conejo frente a VP1 de VEVC o el AcM SD6 frente a VP1 de VFA. Se incluye un lisado de células infectadas 1 h p.i. como control. Las membranas se reincubaron con un AcM anti-actina β como control de carga

Resultados

(Monaghan et al., 2004; O'Donnell et al., 2001). Cuando la BFA se añadió 3 h p.i., se obtuvo una reducción del título viral del VEVC comparable a la obtenida añadiendo BFA antes de la infección (datos no mostrados). Esto confirma que la inhibición debida a la BFA, que también puede afectar a la entrada de virus (Pietiäinen et al., 2004; Sieczkarski y Whittaker, 2002a), estaba afectando principalmente a estadios posteriores a la internalización. Como cabía esperar, el tratamiento con BFA redujo la síntesis de la proteína VP1 en células infectadas con VEVC, pero no en aquellas infectadas con VFA (Fig. 44D). Estos resultados muestran una diferente sensibilidad al tratamiento con BFA de los dos picornavirus incluidos en este estudio (VFA y VEVC) confirmando el requerimiento diferencial de factores celulares implicados en la construcción de los complejos replicativos.

Discusión

6. Discusión

6.1 Etapas tempranas en la infección de VFA

6.1.1 Interacción con el receptor

Las integrinas pueden ser internalizadas por diversos mecanismos, que incluyen tanto la endocitosis mediada por *lipid-rafts/caveolas* y la endocitosis mediada por clatrina, como otras rutas alternativas (Lau y Chou, 2008; Pellinen y Ivaska, 2006). De hecho, algunas integrinas se unen a la caveolina-1 a través de su dominio citosólico y quizás también a través de su dominio transmembrana (Wary et al., 1996; Wary et al., 1998). El aislado de VFA C-S8c1 utilizado en esta Tesis Doctoral, utiliza moléculas de la familia de las integrinas como receptor (Baranowski et al., 1998; Mateu et al., 1996; Nuñez et al., 2007). Esta especificidad de receptor ha sido confirmada por la inhibición de la infectividad observada con un péptido RGD, así como por la incapacidad del virus para infectar células CHO (ver Figs. 15, 31 y 32). En el caso de las células IBRS-2, se trata de la integrina $\alpha_v\beta_8$ (Burman et al., 2006; Nuñez et al., 2007). Sin embargo, la integrina/s que utiliza el virus C-S8c1 en las células BHK-21 no está determinada. Existen evidencias de que estas células expresan integrina $\alpha_v\beta_3$ (Chu y Ng, 2004b), las cadenas α_v y β_1 (aunque la presencia del dímero $\alpha_v\beta_1$ no ha sido demostrado) (Amadori et al., 1997) y la integrina $\alpha_5\beta_1$ (Peng et al., 2004). Esta última, es capaz de interactuar *in vitro* con las partículas de VFA, pero su función como receptor de este virus no ha podido ser demostrada (Jackson et al., 2000a).

6.1.2 Internalización de la partícula viral: papel funcional de la clatrina

Como se comentó en la Introducción, existían evidencias indirectas de la implicación de la clatrina en la ruta de entrada de aislados de VFA de serotipo A y O en células humanas que expresan constitutivamente o están establemente transfectadas con integrinas α_v (apartado 2.4.1.5). En esta Tesis Doctoral, se han obtenido resultados empleando inhibidores farmacológicos, que indican que el virus de serotipo C estudiado entra en células BHK-21 e IBRS-2 de una forma que también es dependiente de clatrina. De hecho, el empleo de una línea establemente transfectada con un RNA inducible frente a la cadena pesada de la clatrina, ha permitido demostrar una dependencia directa de la función de la clatrina para la infección de VFA (Fig. 10). Esta dependencia ha sido comprobada también para VEV, modelo de virus internalizado mediante foseas revestidas de clatrina (Pelkmans et al., 2005). No se puede excluir que la inhibición de la endocitosis dependiente de clatrina pueda alterar la expresión de los

receptores virales en la superficie celular, originando una reducción en la adsorción de las partículas virales que contribuya al efecto inhibitorio. No obstante, las partículas de VFA fueron encontradas adsorbidas a la superficie de las células tratadas con sacarosa, de manera similar a la descrita para VFA de serotipo O (Berryman et al., 2005), lo que sugiere que no se produce una alteración importante en la expresión de las integrinas por el tratamiento con medio hipertónico. Por otro lado, el receptor de TF, que es internalizado de manera dependiente de clatrina, lejos de bajar su nivel de expresión, se acumula en la superficie de las células que expresan el RNA antisentido frente a la clatrina (Iversen et al., 2003). Estos resultados sugieren que la reducción del título viral está probablemente debida a la inhibición en la internalización, en fosetas revestidas de clatrina, de los virus unidos a la superficie. La dependencia de la infección de virus que utilizan esta vía de internalización de la cantidad de cadena pesada de clatrina ha sido descrita previamente utilizando estrategias diferentes (Sun et al., 2005; Wetley et al., 2002). Sin embargo, que tengamos noticias, esta es la primera vez que se ha utilizado una línea celular inducible frente a la cadena pesada de la clatrina para el estudio de la internalización de un virus. Esta nueva estrategia ha sido también aplicada posteriormente con éxito por otros autores en la caracterización de la ruta de entrada de otros virus (Nitschke et al., 2008). De manera análoga, el empleo de líneas celulares inducibles que expresan formas dominantes de la dinamina ha permitido caracterizar las rutas de entrada de diferentes virus (Chung et al., 2005; DeTulleo y Kirchhausen, 1998; Snyers et al., 2003). Sin embargo, las formas dominantes negativas de la dinamina no son específicas exclusivamente de la endocitosis mediada por vesículas revestidas de clatrina (Lamaze et al., 2001; Oh et al., 1998; Pietiäinen et al., 2004).

6.1.3 Internalización de la partícula viral: papel funcional del colesterol

Puesto que tanto las células BHK-21 como IBRS-2 expresan caveolina-1 (Fig. 41B y datos no mostrados) se decidió analizar el papel potencial de las caveolas en la infección de VFA. Estudios previos realizados con VFA de serotipo O habían indicado que la infección de células SW480 establemente transfectadas con la integrina $\alpha_v\beta_6$ no era afectada por el tratamiento con una concentración de M β CD menor que la empleada en este trabajo (Berryman et al., 2005). En nuestro caso, la extracción de colesterol de la membrana plasmática con M β CD ha revelado una dependencia de colesterol para la infección de VFA, aunque tratamientos con inhibidores farmacológicos más específicos de la función de *lipid-rafts/caveolas* (nistatina, filipina y lovastatina) no producen reducciones significativas de la infección de VFA. Estos resultados unidos a que el VFA no induce la fosforilación de la caveolina-1 en la Tyr 14 -necesaria para la internalización de virus vía caveolas (Coyne et al., 2007b) y la internalización de integrinas

mediante caveolas (del Pozo et al., 2005)- sugieren que esta ruta no es utilizada por VFA. De hecho, el tratamiento con M β CD no sólo extrae colesterol de *lipid-rafts*, sino que puede afectar al colesterol contenido en otras regiones de la membrana plasmática (Zidovetzki y Levitan, 2007). El requerimiento de colesterol observado podría deberse a su implicación en la formación de foseas revestidas de clatrina (Rodal et al., 1999; Subtil et al., 1999; Urs et al., 2005) e incluso, a su participación en la penetración del material genético a través de la membrana endosomal (Danthi y Chow, 2004; Imelli et al., 2004).

Tampoco se puede descartar que esté sucediendo con el VFA lo mismo que ocurre con otros virus, como el de la coriomeningitis lifocítica, que son internalizados mediante una ruta dependiente de clatrina y, alternativamente, por una ruta independiente de clatrina. Esta ruta requiere colesterol pero no la función de *lipid-rafts/caveolas*, y es inhibida por M β CD, pero no por nistatina (Quirin et al., 2008).

6.1.4 Papel de la acidificación endosomal

Las integrinas α_v , a diferencia de lo que ocurre con otras integrinas como la α_2 , son internalizadas en endosomas tempranos (Upla et al., 2004). De hecho, cuando el VFA de serotipo O es internalizado junto con la integrina $\alpha_v\beta_6$, ésta colocaliza con marcadores de endosomas tempranos (Berryman et al., 2005; O'Donnell et al., 2005). Mediante tratamiento con inhibidores de la acidificación endosomal (NH₄Cl y Con A) se ha comprobado que la infección del virus C-S8c1 utilizado en este estudio es sensible a la inhibición de la acidificación endosomal, de acuerdo a lo descrito previamente para VFA de serotipo A y O (Baxt, 1987; Berryman et al., 2005; Carrillo et al., 1985; Carrillo et al., 1984; Miller et al., 2001; O'Donnell et al., 2008). La inhibición de la acidificación endosomal no afectó ni a la adsorción ni a la internalización de las partículas de VFA. Sin embargo, éstas quedaron retenidas en compartimientos positivos para el marcador de endosomas tempranos EEA1. Estos resultados indican que en condiciones de acidificación endosomal inhibida, las partículas de VFA no pueden desencapsidar y liberar su material genético, dado que el pH interno del endosoma, desencadenante de la desencapsidación viral, no alcanzaría valores suficientemente ácidos (Curry et al., 1995; Ellard et al., 1999; van Vlijmen et al., 1998).

6.2 Mutantes de VFA con diferentes grados de sensibilidad a pH ácido

Se conocen diferentes mecanismos que permiten a los virus asegurar que su cápsida se desensamble sólo dentro de la célula hospedadora: el pH ácido de los compartimientos endosomales, reacciones de isomerización de puentes disulfuro en el retículo endoplasmático o

una combinación de ambas estrategias (apartado 2.3). El modelo aceptado para la desencapsidación de VFA está basado en la acidificación de los endosomas. De esta manera, la cápsida sólo se desensambla a pH ácido dentro de los endosomas, liberando el material genético viral dentro de la célula hospedadora. Esta característica hace de VFA un virus modelo para el estudio del desensamblaje, inducido por pH ácido, de un virus sin envoltura (Ellard et al., 1999).

Con objeto de caracterizar este proceso de internalización y penetración de VFA se seleccionaron mutantes con diferentes sensibilidades a pH. Por una parte, se seleccionaron mutantes con sensibilidad a pH ácido incrementada, que escapaban al tratamiento con NH_4Cl (inhibidor de la acidificación endosomal). Por otro lado, se obtuvieron mutantes con resistencia a pH ácido incrementada, seleccionados mediante acidificación directa del preparado de virus C-S8c1.

6.2.1 Los mutantes con mayor sensibilidad a pH ácido escapan a la inhibición por NH_4Cl

El NH_4Cl se comporta como una base débil y en su forma no protonada difunde fácilmente a través de las membranas; sin embargo, en los compartimientos ácidos se protona y acumula aumentando el pH de los mismos (Marsh y Helenius, 1989). Los 3 mutantes resistentes a NH_4Cl seleccionados (c1, c2 y c3) utilizaron integrinas como receptor, al igual que el aislado C-S8c1 (ver Fig. 15). Esto indica que el fenotipo de resistencia a NH_4Cl no es el resultado de cambios en la utilización del receptor celular, y sugiere que la ruta de entrada debería ser la misma que la utilizada por el virus C-S8c1 de cuya población fueron seleccionados. El incremento en la sensibilidad a pH ácido se correspondió con el incremento en la capacidad de crecimiento en presencia de NH_4Cl de los mutantes estudiados, lo que explicaría el mecanismo de escape del efecto inhibitorio de la droga. La capacidad de liberar el material genético a un valor de pH más alto (necesitando menor acidificación) es un mecanismo descrito en variantes del virus de la gripe resistentes a tratamientos con inhibidores de la acidificación endosomal. Mutantes del virus de la gripe aislados en presencia de hidrocloreuro de amantidina fueron capaces de desencadenar los cambios conformacionales en la hemaglutinina, que inducen la fusión con la membrana endosomal a valores de pH más alcalinos (Daniels et al., 1985). También se ha descrito un variante del virus de la gripe capaz de inducir fusión a un pH más alto (0.2 unidades) que el parental, originado que la infección por este virus fuese más resistente a los efectos inhibitorios del NH_4Cl (Doms et al., 1985). Hasta donde se tiene noticia, esta es la primera descripción de mutantes de VFA con sensibilidad a pH ácido incrementada. Hasta la fecha, solo se habían descrito mutantes de VFA con resistencia a pH ácido incrementada (Twomey et al., 1995).

El análisis de la secuencia de la región que codifica la cápsida de los mutantes de VFA resistentes a NH_4Cl reveló cambios de aminoácidos diferentes entre cada uno de los virus. Dos de los mutantes contenían cambios en dos residuos de Ala situados muy cerca entre sí en VP3 (A123T en c1 y A118V en c2). Estas posiciones, previamente descritas como invariantes entre aislados de los 7 serotipos de VFA (Carrillo et al., 2005), se encuentran localizadas cerca del borde interpentamérico, y relativamente cerca de residuos de His, predichos como sensores de pH, que se ha propuesto desencadenan la desencapsidación de VFA (VP3 H140 y H143) (van Vlijmen et al., 1998). Se ha propuesto que en el proceso de desencapsidación de VFA juega un papel importante H140, ya que este residuo, se sitúa próximo a la parte positiva del dipolo asociado a una hélice α de VP2 del pentámero vecino. De esta manera, la protonación de la H140 ejercería una repulsión sobre la carga positiva del dipolo de esta hélice α del pentámero vecino, desencadenando el desensamblaje de la cápsida (Curry et al., 1995). Los cambios VP3 A123T y VP3 A118V (encontrados en los virus resistentes a NH_4Cl c1 y c2) suponen la introducción de residuos más voluminosos cerca de la interfase pentamérica, lo que podría generar perturbaciones estructurales que modulen este mecanismo de desencapsidación. Para el mecanismo molecular que media el incremento en la sensibilidad a pH ácido del mutante c3 carecemos, por el momento, de una interpretación estructural.

Los experimentos para determinar la sensibilidad a pH ácido indicaron que mientras que el virus C-S8c1 mostraba valores de pH_{50} (6.58 - 6.60) muy similares a los descritos para VFA de serotipo A (Curry et al., 1995), el mutante c2, con la sustituciones VP3 A118V y VP1 N47D, y los virus recuperados de los clones infecciosos VP3 118V/VP1 47D y VP3 118V presentaban valores de pH_{50} mayores (6.92 - 6.95). Por tanto, un incremento de en torno a 0.3 unidades del valor del pH_{50} de los virus mutantes se asocia con una resistencia completa a la inhibición de la acidificación endosomal producida por NH_4Cl . Los mutantes c1 y c3 que presentaron valores de pH_{50} intermedios (6.70 y 6.78, respectivamente) no escaparon completamente al efecto del NH_4Cl . Estos resultados muestran una gradación en la sensibilidad a pH ácido de los mutantes analizados, que se correlaciona con el diferente grado de resistencia a NH_4Cl de cada mutante.

Los datos actuales apuntan que la desencapsidación de las partículas de VFA tendría lugar en el interior de endosomas tempranos y de reciclaje (Berryman et al., 2005; O'Donnell et al., 2005). Tanto los endosomas tempranos como de reciclaje son compartimentos con pH moderadamente ácido, en torno a 6.5 (Yamashiro et al., 1984). Los valores de pH_{50} determinados experimentalmente son compatibles con que la desencapsidación de VFA tenga lugar en el interior de estos orgánulos. El hecho de que los virus que presentaron valores de pH_{50} sobre 6.9 pudieran escapar completamente del efecto alcalinizante del NH_4Cl estaría indicando que el

tratamiento con NH_4Cl eleva el pH interno de los endosomas hasta valores en torno a 6.9. Por otro lado, el mutante c2 y los derivados recuperados de los clones infecciosos con la mutación VP3 A118V también presentaron resistencia a la inhibición de la acidificación de los endosomas utilizando Con A. Por tanto, el mecanismo de escape del NH_4Cl también genera resistencias frente a otros agentes que elevan el pH endosomal. Estos resultados sugieren que el VFA tiene un considerable potencial para escapar a la inhibición de la infección por agentes que bloquean la acidificación de los endosomas.

La sustitución VP1 N47D, presente en el mutante c2 junto con el cambio VP3 A118V, no tuvo efectos por sí sola sobre la sensibilidad a pH ácido o sobre la resistencia a NH_4Cl . Sin embargo, el virus recuperado del clon infeccioso que portaba únicamente la mutación VP3 A118V produjo placas de un tamaño menor que las de C-S8c1 y las del doble mutante VP1 47D/VP3 118V. Esto sugiere que la sustitución VP1 N47D confiere, en el contexto de secuencia del virus con la mutación A118V en VP3, alguna ventaja que permite una mayor capacidad de crecimiento del virus. En este sentido, la aparición de mutaciones compensatorias en la cápsida de VFA en respuesta a la introducción de mutaciones que afectan su estabilidad ha sido previamente descrita (Mateo et al., 2003; Mateo et al., 2008).

6.2.2 Los mutantes con resistencia incrementada a pH ácido son más sensibles al tratamiento con NH_4Cl

La evolución ha dotado a la cápsida de VFA de un balance entre estabilidad (que asegure la protección del material genético de agresiones ambientales) y labilidad (para permitir la liberación del material genético en el compartimiento adecuado de la célula hospedadora). El equilibrio que gobierna la estabilidad de la cápsida de VFA se puede desplazar aumentando su resistencia tanto a pH ácido (Twomey et al., 1995), como a temperatura (Mateo et al., 2008). El hecho de que se hubieran descrito previamente mutantes de VFA más estables a pH ácido (Twomey et al., 1995) nos animó a intentar aislar mutantes más resistentes a pH ácido a partir del virus C-S8c1. Tratando el preparado viral con pH 6 se aislaron seis clones biológicos (m1 - m6) que presentaban una resistencia incrementada a dicho tratamiento. La frecuencia de selección de estos mutantes en la población de C-S8c1 estuvo en torno 2.9×10^{-5} , un valor considerablemente menor que el encontrado para los mutantes resistentes a NH_4Cl , en torno a 8×10^{-2} . Mientras que los mutantes resistentes a NH_4Cl presentaron cambios de aminoácidos diferentes entre sí, en los seis clones con resistencia a pH 6 incrementada, se seleccionó el cambio de aminoácido VP1 N17D. La limitación de las opciones de VFA para resistir a pH ácido podría deberse a dificultades en la desencapsidación, lo que impediría dar lugar a infecciones

productivas. De hecho, la baja frecuencia con la que fueron aislados los mutantes m1 - m6 sugiere que la adquisición de una mayor resistencia a pH ácido conlleva alguna desventaja selectiva para el virus. Cuando el cambio VP1 N17D se introdujo en el clon infeccioso de VFA, el virus recuperado de la transfección reprodujo el fenotipo de resistencia a pH ácido, confirmando que el cambio VP1 N17D es el responsable del incremento en la resistencia a pH ácido de C-S8c1. No se dispone de una interpretación estructural de cómo la sustitución VP1 N17D media el incremento de la resistencia a pH ácido de las partículas de VFA. Aunque se ha descrito el aislamiento de mutantes con mayor resistencia a pH para otros picornavirus como los rinovirus (Giranda et al., 1992; Skern et al., 1991) y para VFA de serotipo A (Twomey et al., 1995), tampoco se dispone de una explicación molecular para este incremento en la estabilidad de la partícula viral. Aunque el número de mutantes analizados es limitado, los resultados sugieren que mientras que el aumento de la labilidad a pH ácido puede ser producido por diferentes cambios en la cápsida de VFA (confiriendo diferentes grados de resistencia a NH_4Cl), la estabilidad de la cápsida a pH ácido parece conseguirse mediante un número limitado de sustituciones.

En cinco de los mutantes con resistencia a pH 6 incrementada (m1 - m5) se encontró una mezcla adicional de nucleótidos en la posición 2576 que supone la presencia de la sustitución VP3 D9V. El hecho de que la proporción del nucleótido mutado se incrementase en el segundo pase con respecto al primero, podría deberse a que ésta confiriese mayor resistencia a pH ácido. Sin embargo, el mutante m6, que carece de esta sustitución mostró el mismo grado de resistencia que los mutantes m2 - m5, que sí muestran trazas de esta mutación. La aparición de esta mutación es compatible con que esta sea una mutación en respuesta a la introducción del cambio VP3 D9V. En C-S8c1, esta posición está implicada en interacciones interprotoméricas, participando en un puente salino con VP1 K109 (Mateo y Mateu, 2007). Se ha descrito el cambio en esta posición VP3 D9A en derivados de C-S8c1 recuperados de infecciones persistentes en cultivos celulares (Diez et al., 1990; Herrera et al., 2008; Toja et al., 1999). La aparición de mutaciones compensatorias en la cápsida de VFA en respuesta a mutaciones que afectan a la estabilidad de la cápsida ha sido previamente descrita (Mateo et al., 2003; Mateo et al., 2008).

Como era de esperar, todos los mutantes con resistencia a pH ácido incrementada mostraron un aumento en la sensibilidad al tratamiento con NH_4Cl , lo que es consistente con la desencapsidación del VFA en endosomas de la célula hospedadora. Hasta ahora, este modelo se basaba en que: i) las partículas de VFA tratadas *in vitro* con pH ácido se desensamblan en subunidades pentaméricas (Brown, 1972; Newman et al., 1973), ii) evidencias de los tratamientos con agentes que inhiben la acidificación de los endosomas (Baxt, 1987; Carrillo et

al., 1985; Carrillo et al., 1984), iii) calculos *in silico* (van Vlijmen et al., 1998), y iv) colocalizaciones de las partículas virales con marcadores de endosomas (Berryman et al., 2005; O'Donnell et al., 2005). En esta Tesis Doctoral se ha seleccionado un abanico de mutantes con un rango de pH_{50} que va de 6.09 a 6.95 (Figs. 17 y 25). La correlación encontrada entre valores de pH_{50} y sensibilidad a agentes inhibidores de la acidificación endosomal (NH_4Cl y Con A) (Figs. 17 y 25) proporciona nuevas evidencias sobre la relación directa entre la acidificación endosomal y la penetración de VFA para dar lugar a una infección productiva.

6.3 Internalización de VFA inactivado con BEI

Las vacunas basadas en virus inactivado con BEI han jugado un papel clave en el control de la FA, desplazando a otras vacunas basadas en virus inactivado con formaldehído, menos seguras (Barteling, 2004). Mediante sedimentación en gradientes de sacarosa y microscopía electrónica se pudo confirmar que en las suspensiones de virus C-S8c1 inactivado con BEI se encontraban partículas con características comparables (coeficiente de sedimentación y tamaño) a las del virus C-S8c1 infeccioso. Esto ha permitido evaluar la capacidad de estas partículas de ser internalizadas por las células susceptibles. Las partículas inactivadas de VFA son internalizadas por células susceptibles de manera comparable a lo observado con C-S8c1 infeccioso. Además, esta internalización fue dependiente de integrinas, como pudo comprobarse en ensayos de bloqueo de la misma con el AcM neutralizante SD6, dirigido frente a un epítipo localizado en bucle G-H de VP1, y experimentos con péptidos virales que contenían el motivo RGD. Asimismo, las partículas inactivadas no fueron internalizadas por células CHO, que no expresan integrinas descritas como receptor para VFA (Baranowski et al., 1998; Gutierrez-Rivas et al., 2008). Estos resultados indican que la ruta de internalización utilizada por las partículas de VFA inactivadas con BEI es similar a la empleada por partículas infecciosas en células BHK-21. De hecho, la internalización de las partículas inactivadas con BEI fue bloqueada por la inhibición de la endocitosis mediada por clatrina por tratamiento con medio hipertónico (sacarosa), al igual que lo descrito para VFA infeccioso (ver Fig. 9 y Berryman et al., 2005). Aunque el mecanismo de inactivación de la BEI no se ha descrito en detalle (Brown, 2001), parece que implica la modificación (alquilación) del RNA viral, preservando la estructura proteica de la cápsida viral. Esto es compatible con los resultados obtenidos que indican la conservación de la estructura antigénica del loop G-H (sitio A) y su capacidad para interactuar productivamente con integrinas.

En otros modelos (células dendríticas), se ha sugerido que las partículas de VFA inactivadas con BEI pueden también ser internalizadas en forma específica de receptor (Harwood

et al., 2008; Jin et al., 2007). Las condiciones en las que las partículas de VFA inactivadas, incorporadas a las micelas resultantes de su combinación con adyuvantes (Barteling, 2004) interaccionan *in vivo* con las células y tejidos del hospedador son complejas. No obstante, los datos obtenidos sugieren que las partículas inactivadas vacunales podrían ser internalizadas, además de por células del sistema inmune presentadoras de antígeno, por células que expresen integrinas capaces de permitir la adsorción del virus. Aunque va más allá del propósito de esta Tesis Doctoral, pensamos que esta observación podría tener implicaciones en la presentación antigénica de las vacunas inactivadas de VFA. Una posibilidad es la disminución del virus contenido en las vacunas capaz de interaccionar con células del sistema inmune (principalmente células presentadoras de antígeno y/o linfocitos B) debido a la internalización en células susceptibles que las partículas inactivadas. Por otra parte, esta internalización podría activar mecanismos de la respuesta inmune innata basados en sensores virales presentes en los compartimientos endosomales (Kawai y Akira, 2008), así como favorecer el procesamiento y presentación de epítomos de la cápsida viral por vías alternativas a la del MHC de clase II (McCullough y Sobrino, 2004). Asimismo, la posibilidad de que el VFA inactivado sea internalizado por células presentadoras de antígeno de manera específica de receptor, además de por mecanismos como la macropinocitosis, puede dar lugar a alternativas en la internalización y la modulación de la posterior presentación de los antígenos virales.

Por otra parte, la capacidad de las partículas de VFA inactivadas de ser internalizadas dentro de células susceptibles las convierte en una interesante herramienta para determinar hasta donde progresan los componentes de la cápsida de VFA en ausencia de liberación y traducción del RNA viral.

6.4 Diferencias y similitudes en el mecanismo de entrada de VFA, VEVC y VEV

Como se ha comentado en la Introducción, virus de diferentes familias pueden compartir rutas de entrada similares y, por el contrario, virus filogenéticamente relacionados pueden explotar rutas de entrada muy distintas. Teniendo esto en cuenta, se realizó un estudio comparativo de los requerimientos de maquinaria celular implicada en la internalización de los virus responsables de las principales enfermedades vesiculares animales (VFA, VEVC y VEV). Para estos experimentos se utilizó la línea celular IBRS-2, que es susceptible a la infección por los tres virus, y además deriva de cerdo, un hospedador natural común a ellos. Mientras que existía información sobre el mecanismo de internalización de VFA y sobre todo de VEV (apartados 2.4.1.5 y 2.4.3.2), no se disponía de información sobre el mecanismo de entrada del VEVC. A esto hay que añadir que los coxsackievirus son capaces de ser internalizados utilizando

diferentes rutas (Tabla 1), lo cual hace atractivo el estudio de los mecanismos que median su entrada. Nuestros resultados sugieren que el aislado de SVDV utilizado en este estudio -que une CAR como receptor, pero no DAF (Jiménez-Clavero et al., 2005a) y que es también capaz de interactuar con HS (Escribano-Romero et al., 2004)-, podría ser internalizado mediante una ruta dependiente de clatrina y dinamina, como indican los resultados obtenidos con los inhibidores farmacológicos de la ruta de clatrina. Posteriormente, las partículas virales serían transportadas hacia endosomas tempranos, ya que se observó colocalización de las mismas con marcadores de estos orgánulos. Además, la infección de VEVC muestra una dependencia de la acidificación endosomal, al igual que la de VEV y VFA.

La macropinocitosis ha sido implicada en la entrada de enterovirus (Coyne et al., 2007b; Karjalainen et al., 2008; Liberali et al., 2008a). Nuestros resultados sugieren que la infección de ninguno de los tres virus analizados depende de esta ruta, dado que son independientes de la función de PKC y de la integridad del citoesqueleto de actina, dos características importantes de la macropinocitosis (Amstutz et al., 2008; Coyne et al., 2007b). Además, como había sido previamente descrito para VEV (Johannsdottir et al., 2008), la infección de VEVC y VFA es dependiente de la función de una molécula no implicada en la macropinocitosis como la dinamina (Mayor y Pagano, 2007; Swanson, 2008).

El empleo de inhibidores farmacológicos ha permitido encontrar comportamientos diferenciales entre los tres virus estudiados (Tabla VII), que apuntan a su necesidad de usar diferentes factores celulares para su internalización. Estas diferencias podrían indicar la existencia de alternativas dentro de la ruta de endocitosis mediada por clatrina. De hecho, se han publicado recientemente trabajos con ejemplos que apoyan esta diversidad (Benmerah y Lamaze, 2007; Lakadamyali et al., 2006; Leonard et al., 2008; Puthenveedu y von Zastrow, 2006).

De esta manera, la sensibilidad a la extracción de colesterol con M β CD en células IBRS-2 fue mayor para VEVC que para VFA, no siendo significativa en el caso de VEV. Como se ha discutido anteriormente para VFA (apartado 6.1.3), el requerimiento de colesterol de VEVC y VFA es independiente de la fosforilación de caveolina-1, mientras que los tratamientos más específicos que afectan a la endocitosis mediada por *lipid-rafts/caveolas* no afectan la infección de ninguno de los dos virus, sugiriendo que el colesterol requerido no está relacionado con la utilización de esta ruta endocítica. La alta sensibilidad de la infección de VEVC al tratamiento con M β CD podría deberse a que su receptor, CAR, se localiza en microdominios de la membrana plasmática diferentes a los que contienen caveolina-1 y proteínas ancladas a GPI (Ashbourne Excoffon et al., 2003). CAR contiene en su dominio citoplasmático la secuencia YNQV (Stuart et al., 2002), que corresponde con el motivo YXX Φ , donde X corresponde a

cualquier aminoácido y Φ hace referencia a un residuo hidrofóbico. Este motivo está implicado en la interacción con complejos proteicos adaptadores de clatrina (Braulke y Bonifacino, 2008). Así, la infección por virus que son internalizados mediante foseas revestidas de clatrina pero usan CAR como receptor, como el adenovirus tipo 2, sería sensible al tratamiento con M β CD (Imelli et al., 2004). Sin embargo, tampoco se puede excluir que el requerimiento diferencial de colesterol se deba a diferentes mecanismos de escape de los endosomas, ya que el colesterol puede jugar un papel clave en esta etapa y estos procesos pueden verse afectados por el tratamiento con M β CD (Danthi y Chow, 2004; Imelli et al., 2004).

Tabla VII. Resumen de los efectos de los inhibidores en la entrada de VEV, VEVC y VFA^a

Diana celular	Droga	Virus ^b		
		VEV	VEVC	VFA
Dinamina	Dinasora	+(p.i.)	+	+
pH endosomal	NH ₄ Cl	+	+	+
Microtúbulos	Nocodazol	+(p.i.)	+	-
Microfilamentos de actina	Cit D	-	-	-
Maquinaria de señalización celular	OV	+	+(p.i.)	+
	Genisteína	+(p.i.)	+(p.i.)	-
	PP2	+	+	+
	Bis	-	-	-
	Wortmanina	-	-	-
Colesterol	M β CD	-	+	+
	Filipina	-	-	-
	Lovastatina	-	-	-
	Nistatina	-	-	-

^a Sólo se han incluido las drogas probadas con los tres virus.

^b +, Sólo se observó efecto inhibitorio estadísticamente significativo en la infección cuando la droga se añadió preinfección; +(p.i.), la droga tuvo también efecto estadísticamente significativo cuando se añadió p.i.; -, No se encontró efecto estadísticamente significativo cuando la droga se añadió pre- o p.i.

Las diferencias encontradas en nuestros experimentos en la sensibilidad de la infección de los virus a OV (inhibidor de fosfatasa de Tyr) y genisteína (inhibidor de quinasas de Tyr), apuntan hacia un requerimiento diferencial de maquinaria de señalización celular. De hecho, la genisteína puede afectar de diferente manera a la internalización de distintos ligandos a través de la ruta dependiente de clatrina (Lamaze et al., 1993). La capacidad de estos dos fármacos de producir reducciones de la infección a pesar de tener mecanismos de actuación opuestos, ha sido descrita también en otros modelos virales (Pietiäinen et al., 2004), pudiendo deberse a que los fenómenos de señalización que gobiernan la internalización de los ligandos celulares son muy complejos y requieren tanto fosforilaciones como defosforilaciones reguladas de componentes celulares.

El tratamiento con nocodazol mostró que las etapas iniciales de la infección de VEVC son dependientes de la integridad de los microtúbulos, al contrario de lo que ocurre para VFA. La dependencia de la integridad de microtúbulos para las etapas tempranas de la infección de VEV ha sido, también, previamente descrita (Le Blanc et al., 2005). Estos resultados podrían ser explicados porque VEV y VEVC (pero no VFA) necesiten ser transportados a endosomas tardíos/lisosomas para dar lugar a una infección productiva. Sin embargo, tanto el tratamiento con wortmanina como con Bis, que inhiben el transporte de virus desde endosomas tempranos a tardíos (Berryman et al., 2005; Brabec et al., 2006; Chu et al., 2006; Sieczkarski et al., 2003), no tuvieron efecto sobre la infección de ninguno de estos virus. Otra posibilidad para explicar este diferente papel de los microtúbulos en etapas tempranas de la infección es que las partículas virales sean internalizadas en diferentes poblaciones de endosomas tempranos (Lakadamyali et al., 2006). De esta manera, VEVC sería internalizado en la población dinámica de endosomas tempranos, cuya movilidad está mediada por microtúbulos, mientras que VFA sería internalizado en la población estática. En cuanto a VEV, también podría ser internalizado en la población dinámica de endosomas tempranos ya que, como se ha comentado anteriormente, se ha descrito su dependencia de microtúbulos en las etapas tempranas de la infección (Le Blanc et al., 2005). La existencia de diferentes poblaciones de fosetas revestidas sería la responsable de distribuir la carga en las distintas poblaciones de endosomas tempranos (Lakadamyali et al., 2006). De hecho, se ha propuesto que la internalización de ligandos en fosetas revestidas de clatrina depende de diferentes eventos de señalización celular (Warren et al., 1998) e implica diferentes adaptadores específicos (Johannessen et al., 2006; Keyel et al., 2006; Puthenveedu y von Zastrow, 2006). Así pues, los resultados obtenidos en este análisis comparativo de VEV, VEVC y VFA ha permitido revelar diferencias en como son internalizados mediante la ruta de la clatrina, proporcionando nuevas evidencias de la diversidad de esta ruta.

6.5 Complejo de replicación de VEVC: requerimiento diferencial de factores celulares con respecto a VFA y VEV

Los aspectos intracelulares de la patogénesis *in vivo* son complejos. En el caso de los virus, además del necesario reconocimiento eficiente de receptores celulares, se precisa de una serie de interacciones posteriores con la célula hospedadora para el desarrollo del ciclo de infección, lo que en buena medida condiciona el tropismo *in vivo*. En la infección de hospedadores naturales estos requerimientos junto con otros como los derivados de la naturaleza de la respuesta inmune que se induce frente al virus, condicionan propiedades tan importantes

como la virulencia y el rango de hospedador (Domingo et al., 2003b; Nuñez et al., 2007; Whitton et al., 2005).

Al igual que en otros picornavirus (Egger et al., 2000; Gazina et al., 2002; Krogerus et al., 2003; Monaghan et al., 2004), el complejo de replicación de VEVC se organiza perinuclearmente y muestra un patrón citoplasmático punteado cuando se observa mediante microscopía confocal (Fig. 40). Estos experimentos han revelado la colocalización en estas estructuras de proteínas no estructurales y estructurales de VEVC con RNA de doble cadena, sugiriendo que tanto la replicación como la traducción tienen lugar de forma acoplada, como se ha descrito en otros picornavirus (Egger et al., 2000). La infección con VEVC causa dispersión de marcadores de retículo endoplasmático y complejo de Golgi, observación también descrita para otros picornavirus, incluyendo VFA (O'Donnell et al., 2001; Sandoval y Carrasco, 1997; van Kuppeveld et al., 1997).

Estas alteraciones observadas por microscopía confocal en células infectadas con VEVC fueron comprobadas mediante microscopía electrónica. En las células infectadas que mostraron un elevado efecto citopático se pudieron observar citoplasmas completamente llenos de vesículas membranosas, de las cuales una elevada proporción estaba integrada por vesículas con doble membrana y por agrupaciones de vesículas englobadas por otras membranas. Estas estructuras con doble membrana no se observan frecuentemente en las células infectadas con VFA (Monaghan et al., 2004), y podrían reflejar diferentes requerimientos celulares para la organización de sus respectivos complejos de replicación, tales como los descritos para los componentes del recubrimiento de COP-I en otros picornavirus (Gazina et al., 2002).

La BFA afecta a la activación de pequeñas GTPasas, denominadas factores de ribosilación de ADP (Arf), que son reguladores claves de la ruta secretora celular. La acción de la BFA se produce porque esta droga inhibe la actividad de los factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF) encargados de convertir Arf-GDP (inactivo) a Arf-GTP (activo) (Niu et al., 2005; Szul et al., 2005). La BFA inhibe específicamente la actividad de tres GEF en células humanas (GBF1, BIG1 y BIG2) (Casanova, 2007). Puesto que estos factores son requeridos para el transporte retrógrado de vesículas recubiertas de COP-I entre el complejo de Golgi y el retículo endoplasmático, BFA causa el desensamblaje del complejo de Golgi y la redistribución de sus marcadores en el retículo (Belov et al., 2007; Jackson y Casanova, 2000). Los resultados obtenidos (Fig. 44) indican que, BFA inhibe la replicación de VEVC, como se ha descrito para otros enterovirus (Gazina et al., 2002; Maynell et al., 1992), pero no afecta a la replicación del VFA, reproduciendo los resultados obtenidos en células BHK infectadas con VFA de serotipo O y A (Monaghan et al., 2004; O'Donnell et al., 2001). En poliovirus, 3A y

Discusión

3CD median el reclutamiento de Arf específicos y sus correspondientes GEF, que son susceptibles de la inhibición por BFA (Belov et al., 2007; Belov et al., 2005; Niu et al., 2005). Además, los mutantes de poliovirus resistentes a BFA seleccionan mutaciones en las proteínas 2C y 3A (Crotty et al., 2004). La sensibilidad a BFA observada en la infección de VEVC podría sugerir un papel importante de los GEF susceptibles de ser inhibidos por la BFA en la infección de este virus. De hecho, las proteínas 3A de CVB3 y poliovirus son capaces de interactuar con GBF1 (Belov et al., 2008; Wessels et al., 2006b). La unión de GBF1 por la proteína 3A de CVB3 inhibe el transporte entre retículo endoplasmático y complejo de Golgi; sin embargo, esto no ocurre en el caso de la proteína 3A de VFA (Wessels et al., 2006a). De esta manera, la falta de efecto de BFA en la infección de VFA podría deberse a diferencias en la capacidad de las proteínas 3A de estos virus de interactuar con GEF sensibles a BFA. En cuanto a la reducción de la infección de VEV, esta puede deberse a la inhibición de la ruta secretora necesaria para la progresión de todos los componentes de las nuevas partículas virales hasta la membrana plasmática, donde son ensamblados (de Silva et al., 1990; Oda et al., 1990).

La autofagia y el transporte dependiente de vesículas recubiertas de COP-II, que no son inhibidos por la acción de BFA (Belov et al., 2008; Belov et al., 2005), también han sido implicados en la formación de las vesículas intracelulares inducidas por poliovirus (Jackson et al., 2005; Rust et al., 2001; Schlegel et al., 1996; Suhy et al., 2000; Taylor y Kirkegaard, 2008). Las estructuras con doble membrana observadas en las células infectadas con VEVC podrían indicar un origen autofágico. De hecho, diferentes estudios sugieren la implicación de procesos autofágicos en la formación del complejo de replicación de coxsackievirus (Wong et al., 2008; Yoon et al., 2008).

En conjunto, los resultados sugieren que, a pesar de ser capaces de infectar epitelios similares y producir lesiones indistinguibles en los hospedadores naturales (Alexandersen y Mowat, 2005; Cornish et al., 2001; Mulder et al., 1997), VEVC y VFA utilizan diferentes mecanismos para construir su complejo de replicación, los cuales son, a su vez, distintos a los empleados por VEV.

Conclusiones

7. Conclusiones

1. Se ha caracterizado la ruta de entrada en células BHK-21 e IBRS-2 del aislado de VFA de serotipo C, C-S8c1, cuya entrada es dependiente del motivo RGD y está presumiblemente mediada por interacción con integrinas α_v . El mecanismo de entrada requiere endocitosis mediada por vesículas revestidas de clatrina y es dependiente de la acidificación endosomal.
2. Se han aislado y caracterizado mutantes de C-S8c1 con diferentes grados de resistencia a la inhibición de la acidificación endosomal inducida por NH_4Cl . Las partículas virales de estos mutantes presentan una sensibilidad a pH ácido incrementada (0.1 - 0.3 unidades de pH) respecto a C-S8c1 (pH_{50} : 6.6), lo que permite que estos virus desencapsiden a valores de pH más alcalinos que el requerido C-S8c1. El cambio en la posición VP3 A118V de la cápsida, encontrado en uno de estos mutantes, es suficiente para incrementar la sensibilidad a pH ácido de C-S8c1 y de conferir resistencia a tratamientos que inhiben la acidificación de los endosomas (NH_4Cl y Con A).
3. Se han aislado y caracterizado mutantes de C-S8c1 con resistencia incrementada a pH 6 (entre 0.3 - 0.5 unidades de pH respecto a C-S8c1). Estos mutantes presentan una sensibilidad incrementada a tratamientos que inhiben la acidificación de los endosomas (NH_4Cl). El cambio en la posición VP1 N17D de la cápsida viral es suficiente para incrementar la resistencia a pH ácido de los mutantes.
4. Las partículas de C-S8c1 inactivadas con BEI entran en células BHK-21 e IBRS-2 de manera dependiente de RGD y, como se ha observado para el virus infeccioso C-S8c1, esta entrada requiere vesículas revestidas de clatrina.
5. La infección de VEVC es inhibida por tratamientos que inhiben (bloquean) la endocitosis mediada por clatrina. Mediante tratamientos farmacológicos se ha puesto de manifiesto la existencia de similitudes y diferencias en el mecanismo de endocitosis de VFA (C-S8c1), VEVC (SPA/1/'93) y VEV (Indiana). Las diferencias encontradas incluyen el requerimiento diferencial de microtúbulos, colesterol y maquinaria de señalización celular.

Discusión

6. Se ha caracterizado la organización del complejo de replicación de VEVC, realizando un estudio comparativo con VFA y VEV. Como se observa con VFA, el complejo de replicación de VEVC se localiza perinuclearmente y está formado por vesículas citoplasmáticas, aunque presenta abundancia de vesículas de doble membrana. A diferencia de lo que ocurre con VFA, la infección con VEVC y VEV es resistente al tratamiento con BFA.

Bibliografía

8. Bibliografía

- Acosta, E. G., Castilla, V., y Damonte, E. B. (2008). Functional entry of dengue virus into *Aedes albopictus* mosquito cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *J Gen Virol* **89**(Pt 2), 474-84.
- Acharya, R., Fry, E., Stuart, D., Fox, G., Rowlands, D., y Brown, F. (1989). The three-dimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9 Å resolution. *Nature* **337**(6209), 709-16.
- Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S., Itoh, N., Shibuya, M., y Fukami, Y. (1987). Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem* **262**(12), 5592-5.
- Akula, S. M., Naranatt, P. P., Walia, N. S., Wang, F. Z., Fegley, B., y Chandran, B. (2003). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) infection of human fibroblast cells occurs through endocytosis. *J Virol* **77**(14), 7978-90.
- Al-Younes, H. M., Rudel, T., y Meyer, T. F. (1999). Characterization and intracellular trafficking pattern of vacuoles containing *Chlamydia pneumoniae* in human epithelial cells. *Cell Microbiol* **1**(3), 237-47.
- Albertini, A. A., Schoehn, G., Weissenhorn, W., y Ruigrok, R. W. (2008). Structural aspects of rabies virus replication. *Cell Mol Life Sci* **65**(2), 282-94.
- Alberts, A. W., Chen, J., Kuron, G., Hunt, V., Huff, J., Hoffman, C., Rothrock, J., Lopez, M., Joshua, H., Harris, E., Patchett, A., Monaghan, R., Currie, S., Stapley, E., Albers-Schonberg, G., Hensens, O., Hirshfield, J., Hoogsteen, K., Liesch, J., y Springer, J. (1980). Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(7), 3957-61.
- Alcalde, J., Egea, G., y Sandoval, I. V. (1994). gp74 a membrane glycoprotein of the cis-Golgi network that cycles through the endoplasmic reticulum and intermediate compartment. *J Cell Biol* **124**(5), 649-65.
- Alcamí, A., Carrascosa, A. L., y Viñuela, E. (1989). The entry of African swine fever virus into Vero cells. *Virology* **171**(1), 68-75.
- Alexandersen, S., y Mowat, N. (2005). Foot-and-mouth disease: host range and pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* **288**, 9-42.
- Amadori, M., Volpe, G., Defilippi, P., y Berneri, C. (1997). Phenotypic features of BHK-21 cells used for production of foot-and-mouth disease vaccine. *Biologicals* **25**(1), 65-73.
- Amstutz, B., Gastaldelli, M., Kalin, S., Imelli, N., Boucke, K., Wandeler, E., Mercer, J., Hemmi, S., y Greber, U. F. (2008). Subversion of CtBP1-controlled macropinocytosis by human adenovirus serotype 3. *Embo J* **27**(7), 956-969.
- Anderson, H. A., Chen, Y., y Norkin, L. C. (1996). Bound simian virus 40 translocates to caveolin-enriched membrane domains, and its entry is inhibited by drugs that selectively disrupt caveolae. *Mol Biol Cell* **7**(11), 1825-34.
- Andreev, D. E., Fernandez-Miragall, O., Ramajo, J., Dmitriev, S. E., Terenin, I. M., Martinez-Salas, E., y Shatsky, I. N. (2007). Differential factor requirement to assemble translation initiation complexes at the alternative start codons of foot-and-mouth disease virus RNA. *Rna* **13**(8), 1366-74.
- Armas-Portela, R., Parrales, M. A., Albar, J. P., Martínez, A. C., y Ávila, J. (1999). Distribution and characteristics of betaII tubulin-enriched microtubules in interphase cells. *Exp Cell Res* **248**(2), 372-80.

Bibliografía

- Armer, H., Moffat, K., Wileman, T., Belsham, G. J., Jackson, T., Duprex, W. P., Ryan, M., y Monaghan, P. (2008). Foot-and-mouth disease virus, but not bovine enterovirus, targets the host cell cytoskeleton via the nonstructural protein 3Cpro. *J Virol* **82**(21), 10556-66.
- Ashbourne Excoffon, K. J., Moninger, T., y Zabner, J. (2003). The coxsackie B virus and adenovirus receptor resides in a distinct membrane microdomain. *J Virol* **77**(4), 2559-67.
- Autret, A., Martin-Latil, S., Brisac, C., Mousson, L., Colbere-Garapin, F., y Blondel, B. (2008). Early phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway activation limits poliovirus-induced JNK-mediated cell death. *J Virol* **82**(7), 3796-802.
- Bahnemann, H. G. (1975). Binary ethylenimine as an inactivant for foot-and-mouth disease virus and its application for vaccine production. *Arch Virol* **47**(1), 47-56.
- Baranowski, E., Ruiz-Jarabo, C. M., Sevilla, N., Andreu, D., Beck, E., y Domingo, E. (2000). Cell recognition by foot-and-mouth disease virus that lacks the RGD integrin-binding motif: flexibility in aphthovirus receptor usage. *J Virol* **74**(4), 1641-7.
- Baranowski, E., Sevilla, N., Verdaguer, N., Ruiz-Jarabo, C. M., Beck, E., y Domingo, E. (1998). Multiple virulence determinants of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *J Virol* **72**(8), 6362-72.
- Barteling, S. J. (2004). Modern inactivated Foot-and-mouth disease (FMD) vaccines: historical background and key elements in production and use. En "Foot and mouth disease: Current perspectives" (F. Sobrino, y E. Domingo, Eds.). Horizon Bioscience, Norfolk.
- Bauer, M., y Pelkmans, L. (2006). A new paradigm for membrane-organizing and -shaping scaffolds. *FEBS Lett* **580**(23), 5559-64.
- Baxt, B. (1987). Effect of lysosomotropic compounds on early events in foot-and-mouth disease virus replication. *Virus Res* **7**(3), 257-71.
- Baxt, B., y Bachrach, H. L. (1980). Early interactions of foot-and-mouth disease virus with cultured cells. *Virology* **104**(1), 42-55.
- Baxt, B., y Becker, Y. (1990). The effect of peptides containing the arginine-glycine-aspartic acid sequence on the adsorption of foot-and-mouth disease virus to tissue culture cells. *Virus Genes* **4**(1), 73-83.
- Bayer, N., Schober, D., Huttinger, M., Blaas, D., y Fuchs, R. (2001). Inhibition of clathrin-dependent endocytosis has multiple effects on human rhinovirus serotype 2 cell entry. *J Biol Chem* **276**(6), 3952-62.
- Belov, G. A., Altan-Bonnet, N., Kovtunovych, G., Jackson, C. L., Lippincott-Schwartz, J., y Ehrenfeld, E. (2007). Hijacking components of the cellular secretory pathway for replication of poliovirus RNA. *J Virol* **81**(2), 558-67.
- Belov, G. A., Feng, Q., Nikovics, K., Jackson, C. L., y Ehrenfeld, E. (2008). A critical role of a cellular membrane traffic protein in poliovirus RNA replication. *PLoS Pathog* **4**(11), e1000216.
- Belov, G. A., Fogg, M. H., y Ehrenfeld, E. (2005). Poliovirus proteins induce membrane association of GTPase ADP-ribosylation factor. *J Virol* **79**(11), 7207-16.
- Belsham, G. J. (1992). Dual initiation sites of protein synthesis on foot-and-mouth disease virus RNA are selected following internal entry and scanning of ribosomes in vivo. *Embo J* **11**(3), 1105-10.
- Belsham, G. J., Abrams, C. C., King, A. M., Roosien, J., y Vlak, J. M. (1991). Myristoylation of foot-and-mouth disease virus capsid protein precursors is independent of other viral proteins and occurs in both mammalian and insect cells. *J Gen Virol* **72** (Pt 3), 747-51.
- Benmerah, A., y Lamaze, C. (2007). Clathrin-coated pits: vive la difference? *Traffic* **8**(8), 970-82.
- Berryman, S., Clark, S., Monaghan, P., y Jackson, T. (2005). Early events in integrin alphavbeta6-mediated cell entry of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **79**(13), 8519-34.
- Bienz, K., Egger, D., y Pasamontes, L. (1987). Association of polioviral proteins of the P2 genomic region with the viral replication complex and virus-induced membrane synthesis

- as visualized by electron microscopic immunocytochemistry and autoradiography. *Virology* **160**(1), 220-6.
- Birtley, J. R., Knox, S. R., Jaulent, A. M., Brick, P., Leatherbarrow, R. J., y Curry, S. (2005). Crystal structure of foot-and-mouth disease virus 3C protease. New insights into catalytic mechanism and cleavage specificity. *J Biol Chem* **280**(12), 11520-7.
- Blanchard, E., Belouzard, S., Goueslain, L., Wakita, T., Dubuisson, J., Wychowski, C., y Rouille, Y. (2006). Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* **80**(14), 6964-72.
- Bonifacino, J. S., y Traub, L. M. (2003). Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem* **72**, 395-447.
- Borrego, B., Carra, E., García-Ranea, J. A., y Brocchi, E. (2002a). Characterization of neutralization sites on the circulating variant of swine vesicular disease virus (SVDV): a new site is shared by SVDV and the related coxsackie B5 virus. *J Gen Virol* **83**(Pt 1), 35-44.
- Borrego, B., García-Ranea, J. A., Douglas, A., y Brocchi, E. (2002b). Mapping of linear epitopes on the capsid proteins of swine vesicular disease virus using monoclonal antibodies. *J Gen Virol* **83**(Pt 6), 1387-95.
- Borrow, P., y Oldstone, M. B. (1994). Mechanism of lymphocytic choriomeningitis virus entry into cells. *Virology* **198**(1), 1-9.
- Bosch, B., Grigorov, B., Senserrich, J., Clotet, B., Darlix, J. L., Muriaux, D., y Este, J. A. (2008). A clathrin-dynamin-dependent endocytic pathway for the uptake of HIV-1 by direct T cell-T cell transmission. *Antiviral Res* **80**(2), 185-93.
- Boucrot, E., Saffarian, S., Massol, R., Kirchhausen, T., y Ehrlich, M. (2006). Role of lipids and actin in the formation of clathrin-coated pits. *Exp Cell Res* **312**(20), 4036-48.
- Brabec, M., Blaas, D., y Fuchs, R. (2006). Wortmannin delays transfer of human rhinovirus serotype 2 to late endocytic compartments. *Biochem Biophys Res Commun* **348**(2), 741-9.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.
- Brandenburg, B., Lee, L. Y., Lakadamyali, M., Rust, M. J., Zhuang, X., y Hogle, J. M. (2007). Imaging Poliovirus Entry in Live Cells. *PLoS Biol* **5**(7), e183.
- Braulke, T., y Bonifacino, J. S. (2008). Sorting of lysosomal proteins. *Biochim Biophys Acta*.
- Brocchi, E., Zhang, G., Knowles, N. J., Wilsden, G., McCauley, J. W., Marquardt, O., Ohlinger, V. F., y De Simone, F. (1997). Molecular epidemiology of recent outbreaks of swine vesicular disease: two genetically and antigenically distinct variants in Europe, 1987-94. *Epidemiol Infect* **118**(1), 51-61.
- Brodsky, F. M., Chen, C. Y., Knuehl, C., Towler, M. C., y Wakeham, D. E. (2001). Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**, 517-68.
- Brown, F. (1972). Structure-function relationships in foot-and-mouth disease virus. *Adv Exp Med Biol* **31**(0), 19-28.
- Brown, F. (2001). Inactivation of viruses by aziridines. *Vaccine* **20**(3-4), 322-7.
- Brown, J. K., McAleese, S. M., Thornton, E. M., Pate, J. A., Schock, A., Macrae, A. I., Scott, P. R., Miller, H. R., y Collie, D. D. (2006). Integrin-alpha6, a putative receptor for foot-and-mouth disease virus, is constitutively expressed in ruminant airways. *J Histochem Cytochem* **54**(7), 807-16.
- Burman, A., Clark, S., Abrescia, N. G., Fry, E. E., Stuart, D. I., y Jackson, T. (2006). Specificity of the VP1 GH loop of Foot-and-Mouth Disease virus for alpha6 integrins. *J Virol* **80**(19), 9798-810.

Bibliografía

- Campanero-Rhodes, M. A., Smith, A., Chai, W., Sonnino, S., Mauri, L., Childs, R. A., Zhang, Y., Ewers, H., Helenius, A., Imberty, A., y Feizi, T. (2007). N-glycolyl GM1 ganglioside as a receptor for simian virus 40. *J Virol* **81**(23), 12846-58.
- Carrillo, C., Tulman, E. R., Delhon, G., Lu, Z., Carreno, A., Vagnozzi, A., Kutish, G. F., y Rock, D. L. (2005). Comparative genomics of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **79**(10), 6487-504.
- Carrillo, E. C., Giachetti, C., y Campos, R. (1985). Early steps in FMDV replication: further analysis on the effects of chloroquine. *Virology* **147**(1), 118-25.
- Carrillo, E. C., Giachetti, C., y Campos, R. H. (1984). Effect of lysosomotropic agents on the foot-and-mouth disease virus replication. *Virology* **135**(2), 542-5.
- Casanova, J. E. (2007). Regulation of Arf activation: the Sec7 family of guanine nucleotide exchange factors. *Traffic* **8**(11), 1476-85.
- Coil, D. A., y Miller, A. D. (2004). Phosphatidylserine is not the cell surface receptor for vesicular stomatitis virus. *J Virol* **78**(20), 10920-6.
- Collen, T. (1994). Foot-and-mouth disease virus (Aphthovirus): viral T cell epitopes. *En "Cell-mediated immunity in rumiamnts"* (B. M. L. Gooddevis, y I. Morrison, Eds.), pp. 173-197. CRC Press, Boca Raton.
- Conner, S. D., y Schmid, S. L. (2003). Differential requirements for AP-2 in clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol* **162**(5), 773-9.
- Cooper, J. A. (1987). Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J Cell Biol* **105**(4), 1473-8.
- Cornell, C. T., Kiosses, W. B., Harkins, S., y Whitton, J. L. (2006). Inhibition of protein trafficking by coxsackievirus b3: multiple viral proteins target a single organelle. *J Virol* **80**(13), 6637-47.
- Cornell, C. T., Kiosses, W. B., Harkins, S., y Whitton, J. L. (2007). Coxsackievirus B3 proteins directionally complement each other to downregulate surface major histocompatibility complex class I. *J Virol* **81**(13), 6785-97.
- Cornish, T. E., Stallknecht, D. E., Brown, C. C., Seal, B. S., y Howerth, E. W. (2001). Pathogenesis of experimental vesicular stomatitis virus (New Jersey serotype) infection in the deer mouse (*Peromyscus maniculatus*). *Vet Pathol* **38**(4), 396-406.
- Cottam, E. M., Wadsworth, J., Shaw, A. E., Rowlands, R. J., Goatley, L., Maan, S., Maan, N. S., Mertens, P. P., Ebert, K., Li, Y., Ryan, E. D., Juleff, N., Ferris, N. P., Wilesmith, J. W., Haydon, D. T., King, D. P., Paton, D. J., y Knowles, N. J. (2008). Transmission pathways of foot-and-mouth disease virus in the United Kingdom in 2007. *PLoS Pathog* **4**(4), e1000050.
- Coyne, C. B., y Bergelson, J. M. (2006). Virus-induced Abl and Fyn kinase signals permit coxsackievirus entry through epithelial tight junctions. *Cell* **124**(1), 119-31.
- Coyne, C. B., Kim, K. S., y Bergelson, J. M. (2007a). Poliovirus entry into human brain microvascular cells requires receptor-induced activation of SHP-2. *Embo J* **26**(17), 4016-28.
- Coyne, C. B., Shen, L., Turner, J. R., y Bergelson, J. M. (2007b). Coxsackievirus entry across epithelial tight junctions requires occludin and the small GTPases Rab34 and Rab5. *Cell Host Microbe* **2**(3), 181-92.
- Crotty, S., Saleh, M. C., Gitlin, L., Beske, O., y Andino, R. (2004). The poliovirus replication machinery can escape inhibition by an antiviral drug that targets a host cell protein. *J Virol* **78**(7), 3378-86.
- Cubillos, C., de la Torre, B. G., Jakab, A., Clementi, G., Borrás, E., Barcena, J., Andreu, D., Sobrino, F., y Blanco, E. (2008). Enhanced mucosal immunoglobulin A response and solid protection against foot-and-mouth disease virus challenge induced by a novel dendrimeric peptide. *J Virol* **82**(14), 7223-30.

- Curry, S., Abrams, C. C., Fry, E., Crowther, J. C., Belsham, G. J., Stuart, D. I., y King, A. M. (1995). Viral RNA modulates the acid sensitivity of foot-and-mouth disease virus capsids. *J Virol* **69**(1), 430-8.
- Curry, S., Fry, E., Blakemore, W., Abu-Ghazaleh, R., Jackson, T., King, A., Lea, S., Newman, J., Rowlands, D., y Stuart, D. (1996). Perturbations in the surface structure of A22 Iraq foot-and-mouth disease virus accompanying coupled changes in host cell specificity and antigenicity. *Structure* **4**(2), 135-45.
- Curry, S., Fry, E., Blakemore, W., Abu-Ghazaleh, R., Jackson, T., King, A., Lea, S., Newman, J., y Stuart, D. (1997). Dissecting the roles of VP0 cleavage and RNA packaging in picornavirus capsid stabilization: the structure of empty capsids of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **71**(12), 9743-52.
- Chamberlain, L. H. (2004). Detergents as tools for the purification and classification of lipid rafts. *FEBS Lett* **559**(1-3), 1-5.
- Chandran, K., Farsetta, D. L., y Nibert, M. L. (2002). Strategy for nonenveloped virus entry: a hydrophobic conformer of the reovirus membrane penetration protein micro 1 mediates membrane disruption. *J Virol* **76**(19), 9920-33.
- Chardonnet, Y., y Dales, S. (1970). Early events in the interaction of adenoviruses with HeLa cells. I. Penetration of type 5 and intracellular release of the DNA genome. *Virology* **40**(3), 462-77.
- Charpentier, N., Davila, M., Domingo, E., y Escarmis, C. (1996). Long-term, large-population passage of aphthovirus can generate and amplify defective noninterfering particles deleted in the leader protease gene. *Virology* **223**(1), 10-8.
- Chen, C., y Zhuang, X. (2008). Epsin 1 is a cargo-specific adaptor for the clathrin-mediated endocytosis of the influenza virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(33), 11790-5.
- Chen, Y., y Norkin, L. C. (1999). Extracellular simian virus 40 transmits a signal that promotes virus enclosure within caveolae. *Exp Cell Res* **246**(1), 83-90.
- Cheng, Y., Boll, W., Kirchhausen, T., Harrison, S. C., y Walz, T. (2007). Cryo-electron tomography of clathrin-coated vesicles: structural implications for coat assembly. *J Mol Biol* **365**(3), 892-9.
- Chinnapen, D. J., Chinnapen, H., Saslowsky, D., y Lencer, W. I. (2006). Rafting with cholera toxin: endocytosis and trafficking from plasma membrane to ER. *FEMS Microbiol Lett*.
- Chinsangaram, J., Mason, P. W., y Grubman, M. J. (1998). Protection of swine by live and inactivated vaccines prepared from a leader proteinase-deficient serotype A12 foot-and-mouth disease virus. *Vaccine* **16**(16), 1516-22.
- Chu, J. J., Leong, P. W., y Ng, M. L. (2006). Analysis of the endocytic pathway mediating the infectious entry of mosquito-borne flavivirus West Nile into *Aedes albopictus* mosquito (C6/36) cells. *Virology* **349**(2), 463-75.
- Chu, J. J., y Ng, M. L. (2004a). Infectious entry of West Nile virus occurs through a clathrin-mediated endocytic pathway. *J Virol* **78**(19), 10543-55.
- Chu, J. J., y Ng, M. L. (2004b). Interaction of West Nile virus with alpha v beta 3 integrin mediates virus entry into cells. *J Biol Chem* **279**(52), 54533-41.
- Chung, S. K., Kim, J. Y., Kim, I. B., Park, S. I., Paek, K. H., y Nam, J. H. (2005). Internalization and trafficking mechanisms of coxsackievirus B3 in HeLa cells. *Virology* **333**(1), 31-40.
- Daecke, J., Fackler, O. T., Dittmar, M. T., y Krausslich, H. G. (2005). Involvement of clathrin-mediated endocytosis in human immunodeficiency virus type 1 entry. *J Virol* **79**(3), 1581-94.
- Damm, E. M., Pelkmans, L., Kartenbeck, J., Mezzacasa, A., Kurzchalia, T., y Helenius, A. (2005). Clathrin- and caveolin-1-independent endocytosis: entry of simian virus 40 into cells devoid of caveolae. *J Cell Biol* **168**(3), 477-88.

Bibliografía

- Daniels, R. S., Downie, J. C., Hay, A. J., Knossow, M., Skehel, J. J., Wang, M. L., y Wiley, D. C. (1985). Fusion mutants of the influenza virus hemagglutinin glycoprotein. *Cell* **40**(2), 431-9.
- Danthi, P., y Chow, M. (2004). Cholesterol removal by methyl-beta-cyclodextrin inhibits poliovirus entry. *J Virol* **78**(1), 33-41.
- Danthi, P., Tosteson, M., Li, Q. H., y Chow, M. (2003). Genome delivery and ion channel properties are altered in VP4 mutants of poliovirus. *J Virol* **77**(9), 5266-74.
- Das, S. C., Nayak, D., Zhou, Y., y Pattnaik, A. K. (2006). Visualization of intracellular transport of vesicular stomatitis virus nucleocapsids in living cells. *J Virol* **80**(13), 6368-77.
- Day, P. M., Lowy, D. R., y Schiller, J. T. (2003). Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology* **307**(1), 1-11.
- De Castro, M. P. (1964). Behaviour of the foot-and-mouth disease virus in cell cultures: susceptibility of the IB-RS-2 cell line. *Arq Inst Biol Sao Paulo* **31**, 63-78.
- De Diego, M., Brocchi, E., Mackay, D., y De Simone, F. (1997). The non-structural polyprotein 3ABC of foot-and-mouth disease virus as a diagnostic antigen in ELISA to differentiate infected from vaccinated cattle. *Arch Virol* **142**(10), 2021-33.
- de Felipe, P., Hughes, L. E., Ryan, M. D., y Brown, J. D. (2003). Co-translational, intraribosomal cleavage of polypeptides by the foot-and-mouth disease virus 2A peptide. *J Biol Chem* **278**(13), 11441-8.
- de la Torre, J. C., Davila, M., Sobrino, F., Ortin, J., y Domingo, E. (1985). Establishment of cell lines persistently infected with foot-and-mouth disease virus. *Virology* **145**(1), 24-35.
- de Los Santos, T., de Avila Botton, S., Weiblen, R., y Grubman, M. J. (2006). The leader proteinase of foot-and-mouth disease virus inhibits the induction of beta interferon mRNA and blocks the host innate immune response. *J Virol* **80**(4), 1906-14.
- de Los Santos, T., Diaz-San Segundo, F., y Grubman, M. J. (2007). Degradation of nuclear factor kappa B during foot-and-mouth disease virus infection. *J Virol* **81**(23), 12803-15.
- De Matteis, M. A., y Godi, A. (2004). PI-loting membrane traffic. *Nat Cell Biol* **6**(6), 487-92.
- de Silva, A. M., Balch, W. E., y Helenius, A. (1990). Quality control in the endoplasmic reticulum: folding and misfolding of vesicular stomatitis virus G protein in cells and in vitro. *J Cell Biol* **111**(3), 857-66.
- del Pozo, M. A., Balasubramanian, N., Alderson, N. B., Kiosses, W. B., Grande-García, A., Anderson, R. G., y Schwartz, M. A. (2005). Phospho-caveolin-1 mediates integrin-regulated membrane domain internalization. *Nat Cell Biol* **7**(9), 901-8.
- Delagneau, J. F., Bernard, S., y Lenoir, G. (1975). Structural proteins of swine vesicular disease virus. *Biochem Biophys Res Commun* **62**(2), 226-32.
- DeTulleo, L., y Kirchhausen, T. (1998). The clathrin endocytic pathway in viral infection. *Embo J* **17**(16), 4585-93.
- Devaney, M. A., Vakharia, V. N., Lloyd, R. E., Ehrenfeld, E., y Grubman, M. J. (1988). Leader protein of foot-and-mouth disease virus is required for cleavage of the p220 component of the cap-binding protein complex. *J Virol* **62**(11), 4407-9.
- Dicara, D., Burman, A., Clark, S., Berryman, S., Howard, M. J., Hart, I. R., Marshall, J. F., y Jackson, T. (2008). Foot-and-mouth disease virus forms a highly stable, EDTA-resistant complex with its principal receptor, integrin alphavbeta6: implications for infectiousness. *J Virol* **82**(3), 1537-46.
- Dietzen, D. J., Hastings, W. R., y Lublin, D. M. (1995). Caveolin is palmitoylated on multiple cysteine residues. Palmitoylation is not necessary for localization of caveolin to caveolae. *J Biol Chem* **270**(12), 6838-42.
- Diez, J., Davila, M., Escarmis, C., Mateu, M. G., Dominguez, J., Perez, J. J., Giralt, E., Melero, J. A., y Domingo, E. (1990). Unique amino acid substitutions in the capsid proteins of foot-

- and-mouth disease virus from a persistent infection in cell culture. *J Virol* **64**(11), 5519-28.
- Domingo, E., Escarmis, C., Baranowski, E., Ruiz-Jarabo, C. M., Carrillo, E., Nunez, J. I., y Sobrino, F. (2003a). Evolution of foot-and-mouth disease virus. *Virus Res* **91**(1), 47-63.
- Domingo, E., Escarmis, C., Baranowski, E., Ruiz-Jarabo, C. M., Carrillo, E., Nuñez, J. I., y Sobrino, F. (2003b). Evolution of foot-and-mouth disease virus. *Virus Res* **91**(1), 47-63.
- Domingo, E., y Holland, J. J. (1997). RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu Rev Microbiol* **51**, 151-78.
- Domingo, E., Martín, V., Perales, C., Grande-Pérez, A., García-Arriaza, J., y Arias, A. (2006). Viruses as quasispecies: biological implications. *Curr Top Microbiol Immunol* **299**, 51-82.
- Domingo, E., Mateu, M. G., Martínez, M. A., Dopazo, J., Moya, A., y Sobrino, F. (1990). Genetic variability and antigenic diversity of Foot-and-mouth disease virus. En "Applied virology research" (F. A. Murphy, y M. H. V. Van Regenmortel, Eds.), Vol. 2, pp. 233-266. Plenum Publishing Corporation.
- Domingo, E., Verdaguer, N., Ochoa, W. F., Ruiz-Jarabo, C. M., Sevilla, N., Baranowski, E., Mateu, M. G., y Fita, I. (1999). Biochemical and structural studies with neutralizing antibodies raised against foot-and-mouth disease virus. *Virus Res* **62**(2), 169-75.
- Doms, R. W., Helenius, A., y White, J. (1985). Membrane fusion activity of the influenza virus hemagglutinin. The low pH-induced conformational change. *J Biol Chem* **260**(5), 2973-81.
- Drose, S., y Altendorf, K. (1997). Bafilomycins and concanamycins as inhibitors of V-ATPases and P-ATPases. *J Exp Biol* **200**(Pt 1), 1-8.
- Duque, H., y Baxt, B. (2003). Foot-and-mouth disease virus receptors: comparison of bovine alpha(V) integrin utilization by type A and O viruses. *J Virol* **77**(4), 2500-11.
- Eash, S., Querbes, W., y Atwood, W. J. (2004). Infection of vero cells by BK virus is dependent on caveolae. *J Virol* **78**(21), 11583-90.
- Edeling, M. A., Smith, C., y Owen, D. (2006). Life of a clathrin coat: insights from clathrin and AP structures. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(1), 32-44.
- Egger, D., Teterina, N., Ehrenfeld, E., y Bienz, K. (2000). Formation of the poliovirus replication complex requires coupled viral translation, vesicle production, and viral RNA synthesis. *J Virol* **74**(14), 6570-80.
- Ehrlich, M., Boll, W., Van Oijen, A., Hariharan, R., Chandran, K., Nibert, M. L., y Kirchhausen, T. (2004). Endocytosis by random initiation and stabilization of clathrin-coated pits. *Cell* **118**(5), 591-605.
- Ellard, F. M., Drew, J., Blakemore, W. E., Stuart, D. I., y King, A. M. (1999). Evidence for the role of His-142 of protein 1C in the acid-induced disassembly of foot-and-mouth disease virus capsids. *J Gen Virol* **80** (Pt 8), 1911-8.
- Engqvist-Goldstein, A. E., y Drubin, D. G. (2003). Actin assembly and endocytosis: from yeast to mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**, 287-332.
- Escarmis, C., Dávila, M., Charpentier, N., Bracho, A., Moya, A., y Domingo, E. (1996). Genetic lesions associated with Muller's ratchet in an RNA virus. *J Mol Biol* **264**(2), 255-67.
- Escarmis, C., Toja, M., Medina, M., y Domingo, E. (1992). Modifications of the 5' untranslated region of foot-and-mouth disease virus after prolonged persistence in cell culture. *Virus Res* **26**(2), 113-25.
- Escribano-Romero, E., Jiménez-Clavero, M. A., Gomes, P., García-Ranea, J. A., y Ley, V. (2004). Heparan sulphate mediates swine vesicular disease virus attachment to the host cell. *J Gen Virol* **85**(Pt 3), 653-63.
- España, E., Alemany, R., Riera, P., Artigas, C., Rosell, R., Pujols, J., Sanmartín, J., y San Gabriel, A. (1993). Aislamiento del virus de la enfermedad vesicular porcina en España. *Med Vet* **10**, 657-662.

- Ewers, H., Smith, A. E., Sbalzarini, I. F., Lilie, H., Koumoutsakos, P., y Helenius, A. (2005). Single-particle tracking of murine polyoma virus-like particles on live cells and artificial membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(42), 15110-5.
- Falk, M. M., Grigera, P. R., Bergmann, I. E., Zibert, A., Multhaup, G., y Beck, E. (1990). Foot-and-mouth disease virus protease 3C induces specific proteolytic cleavage of host cell histone H3. *J Virol* **64**(2), 748-56.
- Fauquet, C., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L. A., y (Eds.) (2005). " VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses " 8th ed. Academic Press.
- Fernández-Miragall, O., Quinto, S. L., y Martínez-Salas, E. (2009). Relevance of RNA structure for the activity of picornavirus IRES elements. *Virus Res* **139**(2), 172-82.
- Ferrer-Orta, C., Arias, A., Agudo, R., Pérez-Luque, R., Escarmís, C., Domingo, E., y Verdaguer, N. (2006). The structure of a protein primer-polymerase complex in the initiation of genome replication. *Embo J* **25**(4), 880-8.
- Ferrer-Orta, C., Arias, A., Pérez-Luque, R., Escarmís, C., Domingo, E., y Verdaguer, N. (2004). Structure of foot-and-mouth disease virus RNA-dependent RNA polymerase and its complex with a template-primer RNA. *J Biol Chem* **279**(45), 47212-21.
- Ferrer-Orta, C., Arias, A., Pérez-Luque, R., Escarmís, C., Domingo, E., y Verdaguer, N. (2007). Sequential structures provide insights into the fidelity of RNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(22), 9463-8.
- FitzGerald, D. J., Padmanabhan, R., Pastan, I., y Willingham, M. C. (1983). Adenovirus-induced release of epidermal growth factor and pseudomonas toxin into the cytosol of KB cells during receptor-mediated endocytosis. *Cell* **32**(2), 607-17.
- Ford, M. G., Mills, I. G., Peter, B. J., Vallis, Y., Praefcke, G. J., Evans, P. R., y McMahon, H. T. (2002). Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature* **419**(6905), 361-6.
- Forss, S., Strebel, K., Beck, E., y Schaller, H. (1984). Nucleotide sequence and genome organization of foot-and-mouth disease virus. *Nucleic Acids Res* **12**(16), 6587-601.
- Fotin, A., Cheng, Y., Grigorieff, N., Walz, T., Harrison, S. C., y Kirchhausen, T. (2004a). Structure of an auxilin-bound clathrin coat and its implications for the mechanism of uncoating. *Nature* **432**(7017), 649-53.
- Fotin, A., Cheng, Y., Sliz, P., Grigorieff, N., Harrison, S. C., Kirchhausen, T., y Walz, T. (2004b). Molecular model for a complete clathrin lattice from electron cryomicroscopy. *Nature* **432**(7017), 573-9.
- Fox, G., Parry, N. R., Barnett, P. V., McGinn, B., Rowlands, D. J., y Brown, F. (1989). The cell attachment site on foot-and-mouth disease virus includes the amino acid sequence RGD (arginine-glycine-aspartic acid). *J Gen Virol* **70** (Pt 3), 625-37.
- Fry, E. E., Knowles, N. J., Newman, J. W., Wilsden, G., Rao, Z., King, A. M., y Stuart, D. I. (2003). Crystal structure of Swine vesicular disease virus and implications for host adaptation. *J Virol* **77**(9), 5475-86.
- Fry, E. E., Lea, S. M., Jackson, T., Newman, J. W., Ellard, F. M., Blakemore, W. E., Abu-Ghazaleh, R., Samuel, A., King, A. M., y Stuart, D. I. (1999). The structure and function of a foot-and-mouth disease virus-oligosaccharide receptor complex. *Embo J* **18**(3), 543-54.
- Fry, E. E., Newman, J. W., Curry, S., Najjam, S., Jackson, T., Blakemore, W., Lea, S. M., Miller, L., Burman, A., King, A. M., y Stuart, D. I. (2005). Structure of Foot-and-mouth disease virus serotype A10 61 alone and complexed with oligosaccharide receptor: receptor conservation in the face of antigenic variation. *J Gen Virol* **86**(Pt 7), 1909-20.
- Fujita, K., Krishnakumar, S. S., Franco, D., Paul, A. V., London, E., y Wimmer, E. (2007). Membrane topography of the hydrophobic anchor sequence of poliovirus 3A and 3AB

- proteins and the functional effect of 3A/3AB membrane association upon RNA replication. *Biochemistry* **46**(17), 5185-99.
- García-Arriaza, J., Manrubia, S. C., Toja, M., Domingo, E., y Escarmís, C. (2004). Evolutionary transition toward defective RNAs that are infectious by complementation. *J Virol* **78**(21), 11678-85.
- García-Briones, M., Rosas, M. F., González-Magaldi, M., Martín-Acebes, M. A., Sobrino, F., y Armas-Portela, R. (2006). Differential distribution of non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus in BHK-21 cells. *Virology* **349**(2), 409-21.
- Gastaldelli, M., Imelli, N., Boucke, K., Amstutz, B., Meier, O., y Greber, U. F. (2008). Infectious Adenovirus Type 2 Transport Through Early but not Late Endosomes. *Traffic*.
- Gazina, E. V., Mackenzie, J. M., Gorrell, R. J., y Anderson, D. A. (2002). Differential requirements for COPI coats in formation of replication complexes among three genera of Picornaviridae. *J Virol* **76**(21), 11113-22.
- Gilbert, J. M., y Benjamin, T. L. (2000). Early steps of polyomavirus entry into cells. *J Virol* **74**(18), 8582-8.
- Giranda, V. L., Heinz, B. A., Oliveira, M. A., Minor, I., Kim, K. H., Kolatkar, P. R., Rossmann, M. G., y Rueckert, R. R. (1992). Acid-induced structural changes in human rhinovirus 14: possible role in uncoating. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(21), 10213-7.
- Glebov, O. O., Bright, N. A., y Nichols, B. J. (2006). Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells. *Nat Cell Biol* **8**(1), 46-54.
- Greber, U. F., y Way, M. (2006). A superhighway to virus infection. *Cell* **124**(4), 741-54.
- Greber, U. F., Webster, P., Weber, J., y Helenius, A. (1996). The role of the adenovirus protease on virus entry into cells. *Embo J* **15**(8), 1766-77.
- Grubman, M. J., y Baxt, B. (2004). Foot-and-mouth disease. *Clin Microbiol Rev* **17**(2), 465-93.
- Gruenberg, J. (2001). The endocytic pathway: a mosaic of domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(10), 721-30.
- Grummer, B., Grotha, S., y Greiser-Wilke, I. (2004). Bovine viral diarrhoea virus is internalized by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **51**(10), 427-32.
- Grunert, H. P., Wolf, K. U., Langner, K. D., Sawitzky, D., Habermehl, K. O., y Zeichhardt, H. (1997). Internalization of human rhinovirus 14 into HeLa and ICAM-1-transfected BHK cells. *Med Microbiol Immunol* **186**(1), 1-9.
- Gutierrez-Rivas, M., Pulido, M. R., Baranowski, E., Sobrino, F., y Sáiz, M. (2008). Tolerance to mutations in the foot-and-mouth disease virus integrin-binding RGD region is different in cultured cells and in vivo and depends on the capsid sequence context. *J Gen Virol* **89**(Pt 10), 2531-9.
- Hambleton, S., Steinberg, S. P., Gershon, M. D., y Gershon, A. A. (2007). Cholesterol dependence of varicella-zoster virion entry into target cells. *J Virol* **81**(14), 7548-58.
- Hanke, J. H., Gardner, J. P., Dow, R. L., Changelian, P. S., Brissette, W. H., Weringer, E. J., Pollok, B. A., y Connelly, P. A. (1996). Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation. *J Biol Chem* **271**(2), 695-701.
- Hanover, J. A., Willingham, M. C., y Pastan, I. (1984). Kinetics of transit of transferrin and epidermal growth factor through clathrin-coated membranes. *Cell* **39**(2 Pt 1), 283-93.
- Hansen, G. H., Delmas, B., Besnardeau, L., Vogel, L. K., Laude, H., Sjostrom, H., y Noren, O. (1998). The coronavirus transmissible gastroenteritis virus causes infection after receptor-mediated endocytosis and acid-dependent fusion with an intracellular compartment. *J Virol* **72**(1), 527-34.
- Harwood, L. J., Gerber, H., Sobrino, F., Summerfield, A., y McCullough, K. C. (2008). Dendritic cell internalization of foot-and-mouth disease virus: influence of heparan

- sulfate binding on virus uptake and induction of the immune response. *J Virol* **82**(13), 6379-94.
- Helenius, A., Kartenbeck, J., Simons, K., y Fries, E. (1980). On the entry of Semliki forest virus into BHK-21 cells. *J Cell Biol* **84**(2), 404-20.
- Helenius, A., Marsh, M., y White, J. (1982). Inhibition of Semliki forest virus penetration by lysosomotropic weak bases. *J Gen Virol* **58 Pt 1**, 47-61.
- Henley, J. R., Krueger, E. W., Oswald, B. J., y McNiven, M. A. (1998). Dynamin-mediated internalization of caveolae. *J Cell Biol* **141**(1), 85-99.
- Herrera, M., Grande-Pérez, A., Perales, C., y Domingo, E. (2008). Persistence of foot-and-mouth disease virus in cell culture revisited: implications for contingency in evolution. *J Gen Virol* **89**(Pt 1), 232-44.
- Heuser, J. (1980). Three-dimensional visualization of coated vesicle formation in fibroblasts. *J Cell Biol* **84**(3), 560-83.
- Heuser, J. E., y Anderson, R. G. (1989). Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation. *J Cell Biol* **108**(2), 389-400.
- Hinshaw, J. E. (2000). Dynamin and its role in membrane fission. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**, 483-519.
- Horvath, C. A., Vanden Broeck, D., Boulet, G. A., Bogers, J., y De Wolf, M. J. (2007). Epsin: inducing membrane curvature. *Int J Biochem Cell Biol* **39**(10), 1765-70.
- Huang, C. Y., Lu, T. Y., Bair, C. H., Chang, Y. S., Jwo, J. K., y Chang, W. (2008). A novel cellular protein, VPEF, facilitates vaccinia virus penetration into HeLa cells through fluid phase endocytosis. *J Virol* **82**(16), 7988-99.
- Hueffer, K., Palermo, L. M., y Parrish, C. R. (2004). Parvovirus infection of cells by using variants of the feline transferrin receptor altering clathrin-mediated endocytosis, membrane domain localization, and capsid-binding domains. *J Virol* **78**(11), 5601-11.
- Huyer, G., Liu, S., Kelly, J., Moffat, J., Payette, P., Kennedy, B., Tsaprailis, G., Gresser, M. J., y Ramachandran, C. (1997). Mechanism of inhibition of protein-tyrosine phosphatases by vanadate and pervanadate. *J Biol Chem* **272**(2), 843-51.
- Imelli, N., Meier, O., Boucke, K., Hemmi, S., y Greber, U. F. (2004). Cholesterol is required for endocytosis and endosomal escape of adenovirus type 2. *J Virol* **78**(6), 3089-98.
- Inoue, H., Nojima, H., y Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene* **96**(1), 23-8.
- Inoue, T., Suzuki, T., y Sekiguchi, K. (1989). The complete nucleotide sequence of swine vesicular disease virus. *J Gen Virol* **70 (Pt 4)**, 919-34.
- Inoue, T., Yamaguchi, S., Kanno, T., Sugita, S., y Saeki, T. (1993). The complete nucleotide sequence of a pathogenic swine vesicular disease virus isolated in Japan (J1'73) and phylogenetic analysis. *Nucleic Acids Res* **21**(16), 3896.
- Inoue, T., Zhang, Z., Wang, L., West, L., Bashiruddin, J. B., y Belsham, G. J. (2007a). Significance of arginine 20 in the 2A protease for swine vesicular disease virus pathogenicity. *J Gen Virol* **88**(Pt 8), 2275-9.
- Inoue, Y., Tanaka, N., Tanaka, Y., Inoue, S., Morita, K., Zhuang, M., Hattori, T., y Sugamura, K. (2007b). Clathrin-dependent entry of severe acute respiratory syndrome coronavirus into target cells expressing ACE2 with the cytoplasmic tail deleted. *J Virol* **81**(16), 8722-9.
- Irurzun, A., Pérez, L., y Carrasco, L. (1993). Brefeldin A blocks protein glycosylation and RNA replication of vesicular stomatitis virus. *FEBS Lett* **336**(3), 496-500.
- Iversen, T. G., Skretting, G., van Deurs, B., y Sandvig, K. (2003). Clathrin-coated pits with long, dynamin-wrapped necks upon expression of a clathrin antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(9), 5175-80.
- Jackson, C. L., y Casanova, J. E. (2000). Turning on ARF: the Sec7 family of guanine-nucleotide-exchange factors. *Trends Cell Biol* **10**(2), 60-7.

- Jackson, T., Blakemore, W., Newman, J. W., Knowles, N. J., Mould, A. P., Humphries, M. J., y King, A. M. (2000a). Foot-and-mouth disease virus is a ligand for the high-affinity binding conformation of integrin $\alpha 5\beta 1$: influence of the leucine residue within the RGD motif on selectivity of integrin binding. *J Gen Virol* **81**(Pt 5), 1383-91.
- Jackson, T., Clark, S., Berryman, S., Burman, A., Cambier, S., Mu, D., Nishimura, S., y King, A. M. (2004). Integrin $\alpha v\beta 8$ functions as a receptor for foot-and-mouth disease virus: role of the beta-chain cytodomain in integrin-mediated infection. *J Virol* **78**(9), 4533-40.
- Jackson, T., Ellard, F. M., Ghazaleh, R. A., Brookes, S. M., Blakemore, W. E., Corteyn, A. H., Stuart, D. I., Newman, J. W., y King, A. M. (1996). Efficient infection of cells in culture by type O foot-and-mouth disease virus requires binding to cell surface heparan sulfate. *J Virol* **70**(8), 5282-7.
- Jackson, T., Mould, A. P., Sheppard, D., y King, A. M. (2002). Integrin $\alpha v\beta 1$ is a receptor for foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **76**(3), 935-41.
- Jackson, T., Sheppard, D., Denyer, M., Blakemore, W., y King, A. M. (2000b). The epithelial integrin $\alpha v\beta 6$ is a receptor for foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **74**(11), 4949-56.
- Jackson, W. T., Giddings, T. H., Jr., Taylor, M. P., Mulinyawe, S., Rabinovitch, M., Kopito, R. R., y Kirkegaard, K. (2005). Subversion of cellular autophagosomal machinery by RNA viruses. *PLoS Biol* **3**(5), e156.
- Jacobson, K., Mouritsen, O. G., y Anderson, R. G. (2007). Lipid rafts: at a crossroad between cell biology and physics. *Nat Cell Biol* **9**(1), 7-14.
- Jiang, M., Abend, J. R., Tsai, B., y Imperiale, M. J. (2009). Early Events during BK Virus Entry and Disassembly. *J Virol* **83**(3), 1350-8.
- Jiménez-Clavero, M. A., Douglas, A., Lavery, T., García-Ranea, J. A., y Ley, V. (2000). Immune recognition of swine vesicular disease virus structural proteins: novel antigenic regions that are not exposed in the capsid. *Virology* **270**(1), 76-83.
- Jiménez-Clavero, M. A., Escribano-Romero, E., Douglas, A. J., y Ley, V. (2001). The N-terminal region of the VP1 protein of swine vesicular disease virus contains a neutralization site that arises upon cell attachment and is involved in viral entry. *J Virol* **75**(2), 1044-7.
- Jiménez-Clavero, M. A., Escribano-Romero, E., Ley, V., y Spiller, O. B. (2005a). More recent swine vesicular disease virus isolates retain binding to coxsackie-adenovirus receptor, but have lost the ability to bind human decay-accelerating factor (CD55). *J Gen Virol* **86**(Pt 5), 1369-77.
- Jiménez-Clavero, M. A., Escribano-Romero, E., Mansilla, C., Gómez, N., Córdoba, L., Roblas, N., Ponz, F., Ley, V., y Sáiz, J. C. (2005b). Survey of bovine enterovirus in biological and environmental samples by a highly sensitive real-time reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol* **71**(7), 3536-43.
- Jiménez-Clavero, M. A., Escribano-Romero, E., Sánchez-Vizcaíno, J. M., y Ley, V. (1998). Molecular cloning, expression and immunological analysis of the capsid precursor polypeptide (P1) from swine vesicular disease virus. *Virus Res* **57**(2), 163-70.
- Jin, H., Xiao, C., Zhao, G., Du, X., Yu, Y., Kang, Y., y Wang, B. (2007). Induction of immature dendritic cell apoptosis by foot and mouth disease virus is an integrin receptor mediated event before viral infection. *J Cell Biochem* **102**(4), 980-91.
- Jin, M., Park, J., Lee, S., Park, B., Shin, J., Song, K. J., Ahn, T. I., Hwang, S. Y., Ahn, B. Y., y Ahn, K. (2002). Hantaan virus enters cells by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. *Virology* **294**(1), 60-9.
- Johannessen, L. E., Pedersen, N. M., Pedersen, K. W., Madshus, I. H., y Stang, E. (2006). Activation of the epidermal growth factor (EGF) receptor induces formation of EGF receptor- and Grb2-containing clathrin-coated pits. *Mol Cell Biol* **26**(2), 389-401.

- Johannsdottir, H. K., Mancini, R., Kartenbeck, J., Amato, L., y Helenius, A. (2008). Host cell factors and functions involved in Vesicular stomatitis virus entry. *J Virol*.
- Johannsdottir, H. K., Mancini, R., Kartenbeck, J., Amato, L., y Helenius, A. (2009). Host cell factors and functions involved in vesicular stomatitis virus entry. *J Virol* **83**(1), 440-53.
- Joki-Korpela, P., Marjomäki, V., Krogerus, C., Heino, J., y Hyypiä, T. (2001). Entry of human parechovirus 1. *J Virol* **75**(4), 1958-67.
- Karjalainen, M., Kakkonen, E., Upla, P., Paloranta, H., Kankaanpää, P., Liberali, P., Renkema, G. H., Hyypia, T., Heino, J., y Marjomaki, V. (2008). A Raft-derived, Pak1-regulated entry participates in alpha2beta1 integrin-dependent sorting to caveosomes. *Mol Biol Cell* **19**(7), 2857-69.
- Kawai, T., y Akira, S. (2008). Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Ann N Y Acad Sci* **1143**, 1-20.
- Kee, S. H., Cho, E. J., Song, J. W., Park, K. S., Baek, L. J., y Song, K. J. (2004). Effects of endocytosis inhibitory drugs on rubella virus entry into VeroE6 cells. *Microbiol Immunol* **48**(11), 823-9.
- Keller, P., y Simons, K. (1998). Cholesterol is required for surface transport of influenza virus hemagglutinin. *J Cell Biol* **140**(6), 1357-67.
- Kessels, M. M., Dong, J., Leibig, W., Westermann, P., y Qualmann, B. (2006). Complexes of syndapin II with dynamin II promote vesicle formation at the trans-Golgi network. *J Cell Sci* **119**(8), 1504-1516.
- Keyel, P. A., Mishra, S. K., Roth, R., Heuser, J. E., Watkins, S. C., y Traub, L. M. (2006). A single common portal for clathrin-mediated endocytosis of distinct cargo governed by cargo-selective adaptors. *Mol Biol Cell* **17**(10), 4300-17.
- Kilsdonk, E. P., Yancey, P. G., Stoudt, G. W., Bangerter, F. W., Johnson, W. J., Phillips, M. C., y Rothblat, G. H. (1995). Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. *J Biol Chem* **270**(29), 17250-6.
- Kirchhausen, T. (1999). Adaptors for clathrin-mediated traffic. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**, 705-32.
- Kirchhausen, T. (2000). Clathrin. *Annu Rev Biochem* **69**, 699-727.
- Kirchhausen, T., y Harrison, S. C. (1981). Protein organization in clathrin trimers. *Cell* **23**(3), 755-61.
- Knipe, T., Rieder, E., Baxt, B., Ward, G., y Mason, P. W. (1997). Characterization of synthetic foot-and-mouth disease virus provirions separates acid-mediated disassembly from infectivity. *J Virol* **71**(4), 2851-6.
- Knowles, N. J., Wilsden, G., Reid, S. M., Ferris, N. P., King, D. P., Paton, D. J., Fevereiro, M., y Brocchi, E. (2007). Reappearance of swine vesicular disease virus in Portugal. *Vet Rec* **161**(2), 71.
- Knox, C., Moffat, K., Ali, S., Ryan, M., y Wileman, T. (2005). Foot-and-mouth disease virus replication sites form next to the nucleus and close to the Golgi apparatus, but exclude marker proteins associated with host membrane compartments. *J Gen Virol* **86**(Pt 3), 687-96.
- Kolokoltsov, A. A., Fleming, E. H., y Davey, R. A. (2006). Venezuelan equine encephalitis virus entry mechanism requires late endosome formation and resists cell membrane cholesterol depletion. *Virology* **347**(2), 333-42.
- Krishnan, M. N., Sukumaran, B., Pal, U., Agaisse, H., Murray, J. L., Hodge, T. W., y Fikrig, E. (2007). Rab 5 is required for the cellular entry of dengue and West Nile viruses. *J Virol* **81**(9), 4881-5.
- Krogerus, C., Egger, D., Samuilova, O., Hyypia, T., y Bienz, K. (2003). Replication complex of human parechovirus 1. *J Virol* **77**(15), 8512-23.

- Kurzchalia, T. V., Dupree, P., y Monier, S. (1994). VIP21-Caveolin, a protein of the trans-Golgi network and caveolae. *FEBS Lett* **346**(1), 88-91.
- Kurzchalia, T. V., Dupree, P., Parton, R. G., Kellner, R., Virta, H., Lehnert, M., y Simons, K. (1992). VIP21, a 21-kD membrane protein is an integral component of trans-Golgi-network-derived transport vesicles. *J Cell Biol* **118**(5), 1003-14.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259), 680-5.
- Lakadamyali, M., Rust, M. J., Babcock, H. P., y Zhuang, X. (2003). Visualizing infection of individual influenza viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(16), 9280-5.
- Lakadamyali, M., Rust, M. J., y Zhuang, X. (2006). Ligands for clathrin-mediated endocytosis are differentially sorted into distinct populations of early endosomes. *Cell* **124**(5), 997-1009.
- Lamaze, C., Baba, T., Redelmeier, T. E., y Schmid, S. L. (1993). Recruitment of epidermal growth factor and transferrin receptors into coated pits in vitro: differing biochemical requirements. *Mol Biol Cell* **4**(7), 715-27.
- Lamaze, C., Dujeancourt, A., Baba, T., Lo, C. G., Benmerah, A., y Dautry-Varsat, A. (2001). Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. *Mol Cell* **7**(3), 661-71.
- Laniosz, V., Holthusen, K. A., y Meneses, P. I. (2008). Bovine papillomavirus type 1: from clathrin to caveolin. *J Virol* **82**(13), 6288-98.
- Lau, A. W., y Chou, M. M. (2008). The adaptor complex AP-2 regulates post-endocytic trafficking through the non-clathrin Arf6-dependent endocytic pathway. *J Cell Sci* **121**(Pt 24), 4008-17.
- Lau, C., Wang, X., Song, L., North, M., Wiehler, S., Proud, D., y Chow, C. W. (2008). Syk associates with clathrin and mediates phosphatidylinositol 3-kinase activation during human rhinovirus internalization. *J Immunol* **180**(2), 870-80.
- Le Blanc, I., Luyet, P. P., Pons, V., Ferguson, C., Emans, N., Petiot, A., Mayran, N., Demareux, N., Faure, J., Sadoul, R., Parton, R. G., y Gruenberg, J. (2005). Endosome-to-cytosol transport of viral nucleocapsids. *Nat Cell Biol* **7**(7), 653-64.
- Lea, S., Hernandez, J., Blakemore, W., Brocchi, E., Curry, S., Domingo, E., Fry, E., Abu-Ghazaleh, R., King, A., Newman, J., y et al. (1994). The structure and antigenicity of a type C foot-and-mouth disease virus. *Structure* **2**(2), 123-39.
- Lecot, S., Belouzard, S., Dubuisson, J., y Rouille, Y. (2005). Bovine viral diarrhea virus entry is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* **79**(16), 10826-9.
- Lee, J. C., Field, D. J., y Lee, L. L. (1980). Effects of nocodazole on structures of calf brain tubulin. *Biochemistry* **19**(26), 6209-15.
- Lee, S., Zhao, Y., y Anderson, W. F. (1999). Receptor-mediated Moloney murine leukemia virus entry can occur independently of the clathrin-coated-pit-mediated endocytic pathway. *J Virol* **73**(7), 5994-6005.
- Lefrancois, L., y Lyles, D. S. (1982). The interaction of antibody with the major surface glycoprotein of vesicular stomatitis virus. II. Monoclonal antibodies of nonneutralizing and cross-reactive epitopes of Indiana and New Jersey serotypes. *Virology* **121**(1), 168-74.
- Lehmann, M. J., Sherer, N. M., Marks, C. B., Pypaert, M., y Mothes, W. (2005). Actin- and myosin-driven movement of viruses along filopodia precedes their entry into cells. *J Cell Biol* **170**(2), 317-25.
- Leonard, D., Hayakawa, A., Lawe, D., Lambright, D., Bellve, K. D., Standley, C., Lifshitz, L. M., Fogarty, K. E., y Corvera, S. (2008). Sorting of EGF and transferrin at the plasma membrane and by cargo-specific signaling to EEA1-enriched endosomes. *J Cell Sci* **121**(Pt 20), 3445-58.

- Letchworth, G. J., Rodriguez, L. L., y Del carrera, J. (1999). Vesicular stomatitis. *Vet J* **157**(3), 239-60.
- Leveque, N., Norder, H., Zreik, Y., Cartet, G., Falcon, D., Rivat, N., Chomel, J. J., Hong, S. S., y Lina, B. (2007). Echovirus 6 strains derived from a clinical isolate show differences in haemagglutination ability and cell entry pathway. *Virus Res* **130**(1-2), 1-9.
- Li, W., Ross-Smith, N., Proud, C. G., y Belsham, G. J. (2001). Cleavage of translation initiation factor 4AI (eIF4AI) but not eIF4AII by foot-and-mouth disease virus 3C protease: identification of the eIF4AI cleavage site. *FEBS Lett* **507**(1), 1-5.
- Li, Z., Yi, Y., Yin, X., Zhang, Z., y Liu, J. (2008). Expression of foot-and-mouth disease virus capsid proteins in silkworm-baculovirus expression system and its utilization as a subunit vaccine. *PLoS ONE* **3**(5), e2273.
- Liberali, P., Kakkonen, E., Turacchio, G., Valente, C., Spaar, A., Perinetti, G., Bockmann, R. A., Corda, D., Colanzi, A., Marjomäki, V., y Luini, A. (2008a). The closure of Pak1-dependent macropinosomes requires the phosphorylation of CtBP1/BARS. *Embo J* **27**(7), 970-81.
- Liberali, P., Ramo, P., y Pelkmans, L. (2008b). Protein kinases: starting a molecular systems view of endocytosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **24**, 501-23.
- Lichty, B. D., Power, A. T., Stojdl, D. F., y Bell, J. C. (2004). Vesicular stomatitis virus: re-inventing the bullet. *Trends Mol Med* **10**(5), 210-6.
- Liebl, D., Difato, F., Hornikova, L., Mannova, P., Stokrova, J., y Forstova, J. (2006). Mouse polyomavirus enters early endosomes, requires their acidic pH for productive infection, and meets transferrin cargo in Rab11-positive endosomes. *J Virol* **80**(9), 4610-22.
- Lin, F., y Kitching, R. P. (2000). Swine vesicular disease: an overview. *Vet J* **160**(3), 192-201.
- Liu, N. Q., Lossinsky, A. S., Popik, W., Li, X., Gujuluva, C., Kriederman, B., Roberts, J., Pushkarsky, T., Bukrinsky, M., Witte, M., Weinand, M., y Fiala, M. (2002). Human immunodeficiency virus type 1 enters brain microvascular endothelia by macropinocytosis dependent on lipid rafts and the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *J Virol* **76**(13), 6689-700.
- López de Quinto, S., y Martínez-Salas, E. (1999). Involvement of the aphthovirus RNA region located between the two functional AUGs in start codon selection. *Virology* **255**(2), 324-36.
- López de Quinto, S., Sáiz, M., de la Morena, D., Sobrino, F., y Martínez-Salas, E. (2002). IRES-driven translation is stimulated separately by the FMDV 3'-NCR and poly(A) sequences. *Nucleic Acids Res* **30**(20), 4398-405.
- Lukacs, G. L., Segal, G., Kartner, N., Grinstein, S., y Zhang, F. (1997). Constitutive internalization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator occurs via clathrin-dependent endocytosis and is regulated by protein phosphorylation. *Biochem J* **328** (Pt 2), 353-61.
- Luria, S. E., y Burrous, J. W. (1957). Hybridization between Escherichia coli and Shigella. *J Bacteriol* **74**(4), 461-76.
- Macia, E., Ehrlich, M., Massol, R., Boucrot, E., Brunner, C., y Kirchhausen, T. (2006). Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Dev Cell* **10**(6), 839-50.
- Maginnis, M. S., Mainou, B. A., Derdowski, A., Johnson, E. M., Zent, R., y Dermody, T. S. (2008). NPXY motifs in the beta1 integrin cytoplasmic tail are required for functional reovirus entry. *J Virol* **82**(7), 3181-91.
- Marjomäki, V., Pietäinen, V., Matilainen, H., Upla, P., Ivaska, J., Nissinen, L., Reunanen, H., Huttunen, P., Hyypiä, T., y Heino, J. (2002). Internalization of echovirus 1 in caveolae. *J Virol* **76**(4), 1856-65.
- Marsh, M., y Helenius, A. (1989). Virus entry into animal cells. *Adv Virus Res* **36**, 107-51.
- Marsh, M., y Helenius, A. (2006). Virus entry: open sesame. *Cell* **124**(4), 729-40.

- Marshansky, V., y Futai, M. (2008). The V-type H⁺-ATPase in vesicular trafficking: targeting, regulation and function. *Curr Opin Cell Biol* **20**(4), 415-26.
- Martín-Belmonte, F., Martínez-Menárguez, J. A., Aranda, J. F., Ballesta, J., de Marco, M. C., y Alonso, M. A. (2003). MAL regulates clathrin-mediated endocytosis at the apical surface of Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol* **163**(1), 155-64.
- Martín, M. J., Nuñez, J. I., Sobrino, F., y Dopazo, J. (1998). A procedure for detecting selection in highly variable viral genomes: evidence of positive selection in antigenic regions of capsid protein VP1 of foot-and-mouth disease virus. *J Virol Methods* **74**(2), 215-21.
- Martínez-Salas, E., Ortín, J., y Domingo, E. (1985). Sequence of the viral replicase gene from foot-and-mouth disease virus C1-Santa Pau (C-S8). *Gene* **35**(1-2), 55-61.
- Martínez-Salas, E., Pacheco, A., Serrano, P., y Fernández, N. (2008). New insights into internal ribosome entry site elements relevant for viral gene expression. *J Gen Virol* **89**(Pt 3), 611-26.
- Martínez, M. G., Cordo, S. M., y Candurra, N. A. (2007). Characterization of Junin arenavirus cell entry. *J Gen Virol* **88**(Pt 6), 1776-84.
- Mason, P. W., Baxt, B., Brown, F., Harber, J., Murdin, A., y Wimmer, E. (1993). Antibody-complexed foot-and-mouth disease virus, but not poliovirus, can infect normally insusceptible cells via the Fc receptor. *Virology* **192**(2), 568-77.
- Mason, P. W., Piccone, M. E., McKenna, T. S., Chinsangaram, J., y Grubman, M. J. (1997). Evaluation of a live-attenuated foot-and-mouth disease virus as a vaccine candidate. *Virology* **227**(1), 96-102.
- Mateo, R., Díaz, A., Baranowski, E., y Mateu, M. G. (2003). Complete alanine scanning of intersubunit interfaces in a foot-and-mouth disease virus capsid reveals critical contributions of many side chains to particle stability and viral function. *J Biol Chem* **278**(42), 41019-27.
- Mateo, R., Luna, E., Rincón, V., y Mateu, M. G. (2008). Engineering viable foot-and-mouth disease viruses with increased thermostability as a step in the development of improved vaccines. *J Virol* **82**(24), 12232-40.
- Mateo, R., y Mateu, M. G. (2007). Deterministic, compensatory mutational events in the capsid of foot-and-mouth disease virus in response to the introduction of mutations found in viruses from persistent infections. *J Virol* **81**(4), 1879-87.
- Mateu, M. G., Martínez, M. A., Capucci, L., Andreu, D., Giralt, E., Sobrino, F., Brocchi, E., y Domingo, E. (1990). A single amino acid substitution affects multiple overlapping epitopes in the major antigenic site of foot-and-mouth disease virus of serotype C. *J Gen Virol* **71** (Pt 3), 629-37.
- Mateu, M. G., Valero, M. L., Andreu, D., y Domingo, E. (1996). Systematic replacement of amino acid residues within an Arg-Gly-Asp-containing loop of foot-and-mouth disease virus and effect on cell recognition. *J Biol Chem* **271**(22), 12814-9.
- Matlin, K. S., Reggio, H., Helenius, A., y Simons, K. (1981). Infectious entry pathway of influenza virus in a canine kidney cell line. *J Cell Biol* **91**(3 Pt 1), 601-13.
- Matlin, K. S., Reggio, H., Helenius, A., y Simons, K. (1982). Pathway of vesicular stomatitis virus entry leading to infection. *J Mol Biol* **156**(3), 609-31.
- Maynell, L. A., Kirkegaard, K., y Klymkowsky, M. W. (1992). Inhibition of poliovirus RNA synthesis by brefeldin A. *J Virol* **66**(4), 1985-94.
- Mayor, S., y Pagano, R. E. (2007). Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(8), 603-12.
- McCullough, K. C., y Sobrino, F. (2004). Immunology of Foot-and-mouth disease. En "Foot and mouth disease: current perspectives" (F. Sobrino, y E. Domingo, Eds.). Horizon Bioscience, Norfolk.

- McKenna, T. S., Lubroth, J., Rieder, E., Baxt, B., y Mason, P. W. (1995). Receptor binding site-deleted foot-and-mouth disease (FMD) virus protects cattle from FMD. *J Virol* **69**(9), 5787-90.
- Medigeshi, G. R., Hirsch, A. J., Streblow, D. N., Nikolich-Zugich, J., y Nelson, J. A. (2008). West Nile virus entry requires cholesterol-rich membrane microdomains and is independent of alphavbeta3 integrin. *J Virol* **82**(11), 5212-9.
- Medina, M., Domingo, E., Brangwyn, J. K., y Belsham, G. J. (1993). The two species of the foot-and-mouth disease virus leader protein, expressed individually, exhibit the same activities. *Virology* **194**(1), 355-9.
- Meier, O., Boucke, K., Hammer, S. V., Keller, S., Stidwill, R. P., Hemmi, S., y Greber, U. F. (2002). Adenovirus triggers macropinocytosis and endosomal leakage together with its clathrin-mediated uptake. *J Cell Biol* **158**(6), 1119-31.
- Mercer, J., y Helenius, A. (2008). Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. *Science* **320**(5875), 531-5.
- Milstone, A. M., Petrella, J., Sanchez, M. D., Mahmud, M., Whitbeck, J. C., y Bergelson, J. M. (2005). Interaction with coxsackievirus and adenovirus receptor, but not with decay-accelerating factor (DAF), induces A-particle formation in a DAF-binding coxsackievirus B3 isolate. *J Virol* **79**(1), 655-60.
- Miller, K., Shipman, M., Trowbridge, I. S., y Hopkins, C. R. (1991). Transferrin receptors promote the formation of clathrin lattices. *Cell* **65**(4), 621-32.
- Miller, L. C., Blakemore, W., Sheppard, D., Atakilit, A., King, A. M., y Jackson, T. (2001). Role of the cytoplasmic domain of the beta-subunit of integrin alpha(v)beta6 in infection by foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **75**(9), 4158-64.
- Mills, I. G. (2007). The interplay between clathrin-coated vesicles and cell signalling. *Semin Cell Dev Biol* **18**(4), 459-70.
- Moffat, K., Howell, G., Knox, C., Belsham, G. J., Monaghan, P., Ryan, M. D., y Wileman, T. (2005). Effects of foot-and-mouth disease virus nonstructural proteins on the structure and function of the early secretory pathway: 2BC but not 3A blocks endoplasmic reticulum-to-Golgi transport. *J Virol* **79**(7), 4382-95.
- Moffat, K., Knox, C., Howell, G., Clark, S. J., Yang, H., Belsham, G. J., Ryan, M., y Wileman, T. (2007). Inhibition of the secretory pathway by foot-and-mouth disease virus 2BC protein is reproduced by coexpression of 2B with 2C, and the site of inhibition is determined by the subcellular location of 2C. *J Virol* **81**(3), 1129-39.
- Monaghan, P., Cook, H., Jackson, T., Ryan, M., y Wileman, T. (2004). The ultrastructure of the developing replication site in foot-and-mouth disease virus-infected BHK-38 cells. *J Gen Virol* **85**(Pt 4), 933-46.
- Monaghan, P., Gold, S., Simpson, J., Zhang, Z., Weinreb, P. H., Violette, S. M., Alexandersen, S., y Jackson, T. (2005). The alpha(v)beta6 integrin receptor for Foot-and-mouth disease virus is expressed constitutively on the epithelial cells targeted in cattle. *J Gen Virol* **86**(Pt 10), 2769-80.
- Mosso, C., Galvan-Mendoza, I. J., Ludert, J. E., y del Angel, R. M. (2008). Endocytic pathway followed by dengue virus to infect the mosquito cell line C6/36 HT. *Virology* **378**(1), 193-9.
- Mulder, W. A., van Poelwijk, F., Moormann, R. J., Reus, B., Kok, G. L., Pol, J. M., y Dekker, A. (1997). Detection of early infection of swine vesicular disease virus in porcine cells and skin sections. A comparison of immunohistochemistry and in-situ hybridization. *J Virol Methods* **68**(2), 169-75.
- Murata, M., Peranen, J., Schreiner, R., Wieland, F., Kurzchalia, T. V., y Simons, K. (1995). VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(22), 10339-43.

- Nabi, I. R., y Le, P. U. (2003). Caveolae/raft-dependent endocytosis. *J Cell Biol* **161**(4), 673-7.
- Nardelli, L., Lodetti, E., Gualandi, G. L., Burrows, R., Goodridge, D., Brown, F., y Cartwright, B. (1968). A foot and mouth disease syndrome in pigs caused by an enterovirus. *Nature* **219**(5160), 1275-6.
- Nayak, A., Goodfellow, I. G., y Belsham, G. J. (2005). Factors required for the Uridylylation of the foot-and-mouth disease virus 3B1, 3B2, and 3B3 peptides by the RNA-dependent RNA polymerase (3Dpol) in vitro. *J Virol* **79**(12), 7698-706.
- Nayak, A., Goodfellow, I. G., Woolaway, K. E., Birtley, J., Curry, S., y Belsham, G. J. (2006). Role of RNA structure and RNA binding activity of foot-and-mouth disease virus 3C protein in VPg uridylylation and virus replication. *J Virol* **80**(19), 9865-75.
- Neff, S., Sa-Carvalho, D., Rieder, E., Mason, P. W., Blystone, S. D., Brown, E. J., y Baxt, B. (1998). Foot-and-mouth disease virus virulent for cattle utilizes the integrin alpha(v)beta3 as its receptor. *J Virol* **72**(5), 3587-94.
- Newman, J. F., Rowlands, D. J., y Brown, F. (1973). A physico-chemical sub-grouping of the mammalian picornaviruses. *J Gen Virol* **18**(2), 171-80.
- Nitschke, M., Korte, T., Tiesch, C., Ter-Avetisyan, G., Tunnemann, G., Cardoso, M. C., Veit, M., y Herrmann, A. (2008). Equine arteritis virus is delivered to an acidic compartment of host cells via clathrin-dependent endocytosis. *Virology* **377**(2), 248-54.
- Niu, T. K., Pfeifer, A. C., Lippincott-Schwartz, J., y Jackson, C. L. (2005). Dynamics of GBF1, a Brefeldin A-sensitive Arf1 exchange factor at the Golgi. *Mol Biol Cell* **16**(3), 1213-22.
- Nuñez, J. I., Baranowski, E., Molina, N., Ruiz-Jarabo, C. M., Sánchez, C., Domingo, E., y Sobrino, F. (2001). A single amino acid substitution in nonstructural protein 3A can mediate adaptation of foot-and-mouth disease virus to the guinea pig. *J Virol* **75**(8), 3977-83.
- Nuñez, J. I., Molina, N., Baranowski, E., Domingo, E., Clark, S., Burman, A., Berryman, S., Jackson, T., y Sobrino, F. (2007). Guinea pig-adapted foot-and-mouth disease virus with altered receptor recognition can productively infect a natural host. *J Virol* **81**(16), 8497-506.
- O'Donnell, V., Larocco, M., y Baxt, B. (2008). Heparan sulfate-binding foot-and-mouth disease virus enters cells via caveola-mediated endocytosis. *J Virol* **82**(18), 9075-85.
- O'Donnell, V., LaRocco, M., Duque, H., y Baxt, B. (2005). Analysis of foot-and-mouth disease virus internalization events in cultured cells. *J Virol* **79**(13), 8506-18.
- O'Donnell, V. K., Pacheco, J. M., Henry, T. M., y Mason, P. W. (2001). Subcellular distribution of the foot-and-mouth disease virus 3A protein in cells infected with viruses encoding wild-type and bovine-attenuated forms of 3A. *Virology* **287**(1), 151-62.
- Oda, K., Fujiwara, T., y Ikehara, Y. (1990). Brefeldin A arrests the intracellular transport of viral envelope proteins in primary cultured rat hepatocytes and HepG2 cells. *Biochem J* **265**(1), 161-7.
- Oh, P., McIntosh, D. P., y Schnitzer, J. E. (1998). Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium. *J Cell Biol* **141**(1), 101-14.
- Ohkuma, S., y Poole, B. (1978). Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**(7), 3327-31.
- Orlandi, P. A., y Fishman, P. H. (1998). Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains. *J Cell Biol* **141**(4), 905-15.
- Owen, D. J., Collins, B. M., y Evans, P. R. (2004). Adaptors for clathrin coats: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**, 153-91.

- Pacheco, A., Reigadas, S., y Martínez-Salas, E. (2008). Riboproteomic analysis of polypeptides interacting with the internal ribosome-entry site element of foot-and-mouth disease viral RNA. *Proteomics* **8**(22), 4782-4790.
- Pacheco, J. M., Henry, T. M., O'Donnell, V. K., Gregory, J. B., y Mason, P. W. (2003). Role of nonstructural proteins 3A and 3B in host range and pathogenicity of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **77**(24), 13017-27.
- Palade, G. E. (1953). Fine structure of blood capillaries. *J Appl Phys* **24**, 1424.
- Parker, J. S., y Parrish, C. R. (2000). Cellular uptake and infection by canine parvovirus involves rapid dynamin-regulated clathrin-mediated endocytosis, followed by slower intracellular trafficking. *J Virol* **74**(4), 1919-30.
- Parry, N., Fox, G., Rowlands, D., Brown, F., Fry, E., Acharya, R., Logan, D., y Stuart, D. (1990). Structural and serological evidence for a novel mechanism of antigenic variation in foot-and-mouth disease virus. *Nature* **347**(6293), 569-72.
- Parton, R. G., y Simons, K. (2007). The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(3), 185-94.
- Patil, P. K., Suryanarayana, V., Bist, P., Bayry, J., y Natarajan, C. (2002). Integrity of GH-loop of foot-and-mouth disease virus during virus inactivation: detection by epitope specific antibodies. *Vaccine* **20**(7-8), 1163-8.
- Pearse, B. M. (1976). Clathrin: a unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**(4), 1255-9.
- Pelkmans, L. (2005). Secrets of caveolae- and lipid raft-mediated endocytosis revealed by mammalian viruses. *Biochim Biophys Acta* **1746**(3), 295-304.
- Pelkmans, L., Burli, T., Zerial, M., y Helenius, A. (2004). Caveolin-stabilized membrane domains as multifunctional transport and sorting devices in endocytic membrane traffic. *Cell* **118**(6), 767-80.
- Pelkmans, L., Fava, E., Grabner, H., Hannus, M., Habermann, B., Krausz, E., y Zerial, M. (2005). Genome-wide analysis of human kinases in clathrin- and caveolae/raft-mediated endocytosis. *Nature* **436**(7047), 78-86.
- Pelkmans, L., y Helenius, A. (2003). Insider information: what viruses tell us about endocytosis. *Curr Opin Cell Biol* **15**(4), 414-22.
- Pelkmans, L., Kartenbeck, J., y Helenius, A. (2001). Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat Cell Biol* **3**(5), 473-83.
- Pelkmans, L., Puntener, D., y Helenius, A. (2002). Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science* **296**(5567), 535-9.
- Pelkmans, L., y Zerial, M. (2005). Kinase-regulated quantal assemblies and kiss-and-run recycling of caveolae. *Nature* **436**(7047), 128-33.
- Pellinen, T., y Ivaska, J. (2006). Integrin traffic. *J Cell Sci* **119**(Pt 18), 3723-31.
- Peng, J. M., Liang, S. M., y Liang, C. M. (2004). VP1 of foot-and-mouth disease virus induces apoptosis via the Akt signaling pathway. *J Biol Chem* **279**(50), 52168-74.
- Peyroche, A., Antonny, B., Robineau, S., Acker, J., Cherfils, J., y Jackson, C. L. (1999). Brefeldin A acts to stabilize an abortive ARF-GDP-Sec7 domain protein complex: involvement of specific residues of the Sec7 domain. *Mol Cell* **3**(3), 275-85.
- Pho, M. T., Ashok, A., y Atwood, W. J. (2000). JC virus enters human glial cells by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. *J Virol* **74**(5), 2288-92.
- Pierschbacher, M. D., y Ruoslahti, E. (1984). Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* **309**(5963), 30-3.
- Pietäinen, V., Marjomäki, V., Upla, P., Pelkmans, L., Helenius, A., y Hyypiä, T. (2004). Echovirus 1 endocytosis into caveosomes requires lipid rafts, dynamin II, and signaling events. *Mol Biol Cell* **15**(11), 4911-25.

- Powis, G., Bonjouklian, R., Berggren, M. M., Gallegos, A., Abraham, R., Ashendel, C., Zalkow, L., Matter, W. F., Dodge, J., Grindey, G., y et al. (1994). Wortmannin, a potent and selective inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase. *Cancer Res* **54**(9), 2419-23.
- Prchla, E., Kuechler, E., Blaas, D., y Fuchs, R. (1994). Uncoating of human rhinovirus serotype 2 from late endosomes. *J Virol* **68**(6), 3713-23.
- Prchla, E., Plank, C., Wagner, E., Blaas, D., y Fuchs, R. (1995). Virus-mediated release of endosomal content in vitro: different behavior of adenovirus and rhinovirus serotype 2. *J Cell Biol* **131**(1), 111-23.
- Puck, T. T., Cieciura, S. J., y Robinson, A. (1958). Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J Exp Med* **108**(6), 945-56.
- Puthenveedu, M. A., y von Zastrow, M. (2006). Cargo regulates clathrin-coated pit dynamics. *Cell* **127**(1), 113-24.
- Querbes, W., O'Hara, B. A., Williams, G., y Atwood, W. J. (2006). Invasion of host cells by JC virus identifies a novel role for caveolae in endosomal sorting of noncaveolar ligands. *J Virol* **80**(19), 9402-13.
- Quirin, K., Eschli, B., Scheu, I., Poort, L., Kartenbeck, J., y Helenius, A. (2008). Lymphocytic choriomeningitis virus uses a novel endocytic pathway for infectious entry via late endosomes. *Virology* **378**(1), 21-33.
- Rajendran, L., y Simons, K. (2005). Lipid rafts and membrane dynamics. *J Cell Sci* **118**(Pt 6), 1099-102.
- Rappoport, J. Z. (2008). Focusing on clathrin-mediated endocytosis. *Biochem J* **412**(3), 415-23.
- Rebel, J. M., Leendertse, C. H., Dekker, A., y Moormann, R. J. (2003). Effects of mutations in the VP2/VP4 cleavage site of Swine vesicular disease virus on RNA encapsidation and viral infectivity. *Arch Virol* **148**(9), 1747-56.
- Renau, J., y Megías, L. (1998). "Manual de Técnicas de Microscopía Electrónica (M.E.T.). Aplicaciones Biológicas." Universidad de Granada.
- Richter, T., Floetenmeyer, M., Ferguson, C., Galea, J., Goh, J., Lindsay, M. R., Morgan, G. P., Marsh, B. J., y Parton, R. G. (2008). High-resolution 3D quantitative analysis of caveolar ultrastructure and caveola-cytoskeleton interactions. *Traffic* **9**(6), 893-909.
- Rindler, M. J., Ivanov, I. E., Plesken, H., Rodriguez-Boulan, E., y Sabatini, D. D. (1984). Viral glycoproteins destined for apical or basolateral plasma membrane domains traverse the same Golgi apparatus during their intracellular transport in doubly infected Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol* **98**(4), 1304-19.
- Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y., y Zerial, M. (2005). Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell* **122**(5), 735-49.
- Roche, S., Albertini, A. A., Lepault, J., Bressanelli, S., y Gaudin, Y. (2008). Structures of vesicular stomatitis virus glycoprotein: membrane fusion revisited. *Cell Mol Life Sci* **65**(11), 1716-28.
- Roche, S., Bressanelli, S., Rey, F. A., y Gaudin, Y. (2006). Crystal structure of the low-pH form of the vesicular stomatitis virus glycoprotein G. *Science* **313**(5784), 187-91.
- Roche, S., Rey, F. A., Gaudin, Y., y Bressanelli, S. (2007). Structure of the prefusion form of the vesicular stomatitis virus glycoprotein G. *Science* **315**(5813), 843-8.
- Rodal, S. K., Skretting, G., Garred, O., Vilhardt, F., van Deurs, B., y Sandvig, K. (1999). Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles. *Mol Biol Cell* **10**(4), 961-74.
- Rodríguez, L. L. (2002). Emergence and re-emergence of vesicular stomatitis in the United States. *Virus Res* **85**(2), 211-9.

- Rodríguez Pulido, M., Serrano, P., Sáiz, M., y Martínez-Salas, E. (2007). Foot-and-mouth disease virus infection induces proteolytic cleavage of PTB, eIF3a,b, and PABP RNA-binding proteins. *Virology* **364**(2), 466-74.
- Rojek, J. M., Pérez, M., y Kunz, S. (2008a). Cellular entry of lymphocytic choriomeningitis virus. *J Virol* **82**(3), 1505-17.
- Rojek, J. M., Sánchez, A. B., Nguyen, N. T., de la Torre, J. C., y Kunz, S. (2008b). Different mechanisms of cell entry by human-pathogenic Old World and New World arenaviruses. *J Virol* **82**(15), 7677-87.
- Rollason, R., Korolchuk, V., Hamilton, C., Schu, P., y Banting, G. (2007). Clathrin-mediated endocytosis of a lipid-raft-associated protein is mediated through a dual tyrosine motif. *J Cell Sci* **120**(Pt 21), 3850-8.
- Rosas, M. F., Vieira, Y. A., Postigo, R., Martín-Acebes, M. A., Armas-Portela, R., Martínez-Salas, E., y Sobrino, F. (2008). Susceptibility to viral infection is enhanced by stable expression of 3A or 3AB proteins from foot-and-mouth disease virus. *Virology* **380**(1), 34-45.
- Ross, S. R., Schofield, J. J., Farr, C. J., y Bucan, M. (2002). Mouse transferrin receptor 1 is the cell entry receptor for mouse mammary tumor virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(19), 12386-90.
- Rossmann, M. G., Mesyanzhinov, V. V., Arisaka, F., y Leiman, P. G. (2004). The bacteriophage T4 DNA injection machine. *Curr Opin Struct Biol* **14**(2), 171-80.
- Roth, T. F., y Porter, K. R. (1964). Yolk Protein Uptake in the Oocyte of the Mosquito *Aedes Aegypti*. L. *J Cell Biol* **20**, 313-32.
- Rothberg, K. G., Heuser, J. E., Donzell, W. C., Ying, Y. S., Glenney, J. R., y Anderson, R. G. (1992). Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* **68**(4), 673-82.
- Rust, M. J., Lakadamyali, M., Zhang, F., y Zhuang, X. (2004). Assembly of endocytic machinery around individual influenza viruses during viral entry. *Nat Struct Mol Biol* **11**(6), 567-73.
- Rust, R. C., Landmann, L., Gosert, R., Tang, B. L., Hong, W., Hauri, H. P., Egger, D., y Bienz, K. (2001). Cellular COPII proteins are involved in production of the vesicles that form the poliovirus replication complex. *J Virol* **75**(20), 9808-18.
- Ryan, M. D., Donnelly, M. L. L., Flint, M., Cowton, V. M., Luke, G., Hughes, L. E., Knox, C., y De Felipe, P. (2004). Foot-and-mouth disease virus proteinases. En "Foot and mouth disease: Current perspectives" (F. Sobrino, y E. Domingo, Eds.). Horizon Bioscience, Norfolk.
- Sá-Carvalho, D., Rieder, E., Baxt, B., Rodarte, R., Tanuri, A., y Mason, P. W. (1997). Tissue culture adaptation of foot-and-mouth disease virus selects viruses that bind to heparin and are attenuated in cattle. *J Virol* **71**(7), 5115-23.
- Sáiz, M., Gomez, S., Martínez-Salas, E., y Sobrino, F. (2001). Deletion or substitution of the aphthovirus 3' NCR abrogates infectivity and virus replication. *J Gen Virol* **82**(Pt 1), 93-101.
- Sáiz, M., Nuñez, J. I., Jiménez-Clavero, M. A., Baranowski, E., y Sobrino, F. (2002). Foot-and-mouth disease virus: biology and prospects for disease control. *Microbes Infect* **4**(11), 1183-92.
- Sambrook, J., y Russell, D. W. (2001). "Molecular cloning: a laboratory manual." Third ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sánchez-San Martín, C., Lopez, T., Arias, C. F., y Lopez, S. (2004). Characterization of rotavirus cell entry. *J Virol* **78**(5), 2310-8.
- Sandoval, I. V., y Carrasco, L. (1997). Poliovirus infection and expression of the poliovirus protein 2B provoke the disassembly of the Golgi complex, the organelle target for the antipoliovirus drug Ro-090179. *J Virol* **71**(6), 4679-93.

- Sandvig, K., y van Deurs, B. (2005). Delivery into cells: lessons learned from plant and bacterial toxins. *Gene Ther* **12**(11), 865-72.
- Santos, R. I., Rodrigues, A. H., Silva, M. L., Mortara, R. A., Rossi, M. A., Jamur, M. C., Oliver, C., y Arruda, E. (2008). Oropouche virus entry into HeLa cells involves clathrin and requires endosomal acidification. *Virus Res* **138**(1-2), 139-43.
- Sanz-Parra, A., Sobrino, F., y Ley, V. (1998). Infection with foot-and-mouth disease virus results in a rapid reduction of MHC class I surface expression. *J Gen Virol* **79** (Pt 3), 433-6.
- Saraste, J., y Goud, B. (2007). Functional symmetry of endomembranes. *Mol Biol Cell* **18**(4), 1430-6.
- Schelhaas, M., Ewers, H., Rajamaki, M. L., Day, P. M., Schiller, J. T., y Helenius, A. (2008). Human papillomavirus type 16 entry: retrograde cell surface transport along actin-rich protrusions. *PLoS Pathog* **4**(9), e1000148.
- Schelhaas, M., Malmstrom, J., Pelkmans, L., Haugstetter, J., Ellgaard, L., Grunewald, K., y Helenius, A. (2007). Simian Virus 40 depends on ER protein folding and quality control factors for entry into host cells. *Cell* **131**(3), 516-29.
- Schlegel, A., Giddings, T. H., Jr., Ladinsky, M. S., y Kirkegaard, K. (1996). Cellular origin and ultrastructure of membranes induced during poliovirus infection. *J Virol* **70**(10), 6576-88.
- Schlegel, R., Tralka, T. S., Willingham, M. C., y Pastan, I. (1983). Inhibition of VSV binding and infectivity by phosphatidylserine: is phosphatidylserine a VSV-binding site? *Cell* **32**(2), 639-46.
- Schnitzer, J. E., Oh, P., Pinney, E., y Allard, J. (1994). Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. *J Cell Biol* **127**(5), 1217-32.
- Schober, D., Kronenberger, P., Prchla, E., Blaas, D., y Fuchs, R. (1998). Major and minor receptor group human rhinoviruses penetrate from endosomes by different mechanisms. *J Virol* **72**(2), 1354-64.
- Schwartz, S. L., Cao, C., Pylypenko, O., Rak, A., y Wandinger-Ness, A. (2007). Rab GTPases at a glance. *J Cell Sci* **120**(Pt 22), 3905-10.
- Seechurn, P., Knowles, N. J., y McCauley, J. W. (1990). The complete nucleotide sequence of a pathogenic swine vesicular disease virus. *Virus Res* **16**(3), 255-74.
- Serrano, P., Pulido, M. R., Saiz, M., y Martinez-Salas, E. (2006). The 3' end of the foot-and-mouth disease virus genome establishes two distinct long-range RNA-RNA interactions with the 5' end region. *J Gen Virol* **87**(Pt 10), 3013-22.
- Shajahan, A. N., Timblin, B. K., Sandoval, R., Tiruppathi, C., Malik, A. B., y Minshall, R. D. (2004). Role of Src-induced dynamin-2 phosphorylation in caveolae-mediated endocytosis in endothelial cells. *J Biol Chem* **279**(19), 20392-400.
- Shaw, A. E., Reid, S. M., Knowles, N. J., Hutchings, G. H., Wilsden, G., Brocchi, E., Paton, D., y King, D. P. (2005). Sequence analysis of the 5' untranslated region of swine vesicular disease virus reveals block deletions between the end of the internal ribosomal entry site and the initiation codon. *J Gen Virol* **86**(Pt 10), 2753-61.
- Shin, J., Jo, H., y Park, H. (2006). Caveolin-1 is transiently dephosphorylated by shear stress-activated protein tyrosine phosphatase mu. *Biochem Biophys Res Commun* **339**(3), 737-41.
- Shvartsman, D. E., Gutman, O., Tietz, A., y Henis, Y. I. (2006). Cyclodextrins but not compactin inhibit the lateral diffusion of membrane proteins independent of cholesterol. *Traffic* **7**(7), 917-26.
- Sieczkarski, S. B., Brown, H. A., y Whittaker, G. R. (2003). Role of protein kinase C betaII in influenza virus entry via late endosomes. *J Virol* **77**(1), 460-9.
- Sieczkarski, S. B., y Whittaker, G. R. (2002a). Dissecting virus entry via endocytosis. *J Gen Virol* **83**(Pt 7), 1535-45.

- Sieczkarski, S. B., y Whittaker, G. R. (2002b). Influenza virus can enter and infect cells in the absence of clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* **76**(20), 10455-64.
- Sieczkarski, S. B., y Whittaker, G. R. (2003). Differential requirements of Rab5 and Rab7 for endocytosis of influenza and other enveloped viruses. *Traffic* **4**(5), 333-43.
- Sieczkarski, S. B., y Whittaker, G. R. (2005). Viral entry. *Curr Top Microbiol Immunol* **285**, 1-23.
- Sierra, M., Airaksinen, A., González-Lopez, C., Agudo, R., Arias, A., y Domingo, E. (2007). Foot-and-mouth disease virus mutant with decreased sensitivity to ribavirin: implications for error catastrophe. *J Virol* **81**(4), 2012-24.
- Simons, K., y Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**(6633), 569-72.
- Simpson, R. W., Hauser, R. E., y Dales, S. (1969). Viropexis of vesicular stomatitis virus by L cells. *Virology* **37**(2), 285-90.
- Skern, T., Torgersen, H., Auer, H., Kuechler, E., y Blaas, D. (1991). Human rhinovirus mutants resistant to low pH. *Virology* **183**(2), 757-63.
- Smith, A. E., y Helenius, A. (2004). How viruses enter animal cells. *Science* **304**(5668), 237-42.
- Smith, J. L., Campos, S. K., y Ozburn, M. A. (2007). Human papillomavirus type 31 uses a caveolin 1- and dynamin 2-mediated entry pathway for infection of human keratinocytes. *J Virol* **81**(18), 9922-31.
- Smith, J. L., Campos, S. K., Wandinger-Ness, A., y Ozburn, M. A. (2008). Caveolin-1-dependent infectious entry of human papillomavirus type 31 in human keratinocytes proceeds to the endosomal pathway for pH-dependent uncoating. *J Virol* **82**(19), 9505-12.
- Snyers, L., Zwickl, H., y Blaas, D. (2003). Human rhinovirus type 2 is internalized by clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* **77**(9), 5360-9.
- Sobrinho, F., Dávila, M., Ortín, J., y Domingo, E. (1983). Multiple genetic variants arise in the course of replication of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *Virology* **128**(2), 310-8.
- Sobrinho, F., y Domingo, E. (2001). Foot-and-mouth disease in Europe. FMD is economically the most important disease of farm animals. Its re-emergence in Europe is likely to have consequences that go beyond severe alterations of livestock production and trade. *EMBO Rep* **2**(6), 459-61.
- Sobrinho, F., Sáiz, M., Jiménez-Clavero, M. A., Nuñez, J. I., Rosas, M. F., Baranowski, E., y Ley, V. (2001). Foot-and-mouth disease virus: a long known virus, but a current threat. *Vet Res* **32**(1), 1-30.
- Sorkin, A. (2004). Cargo recognition during clathrin-mediated endocytosis: a team effort. *Curr Opin Cell Biol* **16**(4), 392-9.
- Spoden, G., Freitag, K., Husmann, M., Boller, K., Sapp, M., Lambert, C., y Florin, L. (2008). Clathrin- and caveolin-independent entry of human papillomavirus type 16--involvement of tetraspanin-enriched microdomains (TEMs). *PLoS ONE* **3**(10), e3313.
- Stoddart, A., Dykstra, M. L., Brown, B. K., Song, W., Pierce, S. K., y Brodsky, F. M. (2002). Lipid rafts unite signaling cascades with clathrin to regulate BCR internalization. *Immunity* **17**(4), 451-62.
- Stoker, M., y Macpherson, I. (1964). Syrian Hamster Fibroblast Cell Line BHK21 and Its Derivatives. *Nature* **203**, 1355-7.
- Strong, R., y Belsham, G. J. (2004). Sequential modification of translation initiation factor eIF4GI by two different foot-and-mouth disease virus proteases within infected baby hamster kidney cells: identification of the 3Cpro cleavage site. *J Gen Virol* **85**(Pt 10), 2953-62.
- Stuart, A. D., Eustace, H. E., McKee, T. A., y Brown, T. D. (2002). A novel cell entry pathway for a DAF-using human enterovirus is dependent on lipid rafts. *J Virol* **76**(18), 9307-22.

- Subtil, A., Gaidarov, I., Kobylarz, K., Lampson, M. A., Keen, J. H., y McGraw, T. E. (1999). Acute cholesterol depletion inhibits clathrin-coated pit budding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(12), 6775-80.
- Suhy, D. A., Giddings, T. H., Jr., y Kirkegaard, K. (2000). Remodeling the endoplasmic reticulum by poliovirus infection and by individual viral proteins: an autophagy-like origin for virus-induced vesicles. *J Virol* **74**(19), 8953-65.
- Sun, X., Yau, V. K., Briggs, B. J., y Whittaker, G. R. (2005). Role of clathrin-mediated endocytosis during vesicular stomatitis virus entry into host cells. *Virology* **338**(1), 53-60.
- Superti, F., Seganti, L., Ruggeri, F. M., Tinari, A., Donelli, G., y Orsi, N. (1987). Entry pathway of vesicular stomatitis virus into different host cells. *J Gen Virol* **68** (Pt 2), 387-99.
- Swanson, J. A. (2008). Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(8), 639-49.
- Swanson, J. A., y Watts, C. (1995). Macropinocytosis. *Trends Cell Biol* **5**(11), 424-8.
- Szul, T., Garcia-Mata, R., Brandon, E., Shestopal, S., Alvarez, C., y Sztul, E. (2005). Dissection of membrane dynamics of the ARF-guanine nucleotide exchange factor GBF1. *Traffic* **6**(5), 374-85.
- Taboga, O., Tami, C., Carrillo, E., Nuñez, J. I., Rodríguez, A., Sáiz, J. C., Blanco, E., Valero, M. L., Roig, X., Camarero, J. A., Andreu, D., Mateu, M. G., Giralt, E., Domingo, E., Sobrino, F., y Palma, E. L. (1997). A large-scale evaluation of peptide vaccines against foot-and-mouth disease: lack of solid protection in cattle and isolation of escape mutants. *J Virol* **71**(4), 2606-14.
- Tagawa, A., Mezzacasa, A., Hayer, A., Longatti, A., Pelkmans, L., y Helenius, A. (2005). Assembly and trafficking of caveolar domains in the cell: caveolae as stable, cargo-triggered, vesicular transporters. *J Cell Biol* **170**(5), 769-79.
- Takada, Y., Ye, X., y Simon, S. (2007). The integrins. *Genome Biol* **8**(5), 215.
- Tang, Z., Scherer, P. E., Okamoto, T., Song, K., Chu, C., Kohtz, D. S., Nishimoto, I., Lodish, H. F., y Lisanti, M. P. (1996). Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J Biol Chem* **271**(4), 2255-61.
- Taylor, M. P., y Kirkegaard, K. (2008). Potential subversion of autophagosomal pathway by picornaviruses. *Autophagy* **4**(3), 286-9.
- Thomas, C. M., y Smart, E. J. (2008). Caveolae structure and function. *J Cell Mol Med* **12**(3), 796-809.
- Thompson, D., Muriel, P., Russell, D., Osborne, P., Bromley, A., Rowland, M., Creigh-Tyte, S., y Brown, C. (2002). Economic costs of the foot and mouth disease outbreak in the United Kingdom in 2001. *Rev Sci Tech* **21**(3), 675-87.
- Toja, M., Escarmis, C., y Domingo, E. (1999). Genomic nucleotide sequence of a foot-and-mouth disease virus clone and its persistent derivatives. Implications for the evolution of viral quasispecies during a persistent infection. *Virus Res* **64**(2), 161-71.
- Toullec, D., Pianetti, P., Coste, H., Bellevergue, P., Grand-Perret, T., Ajakane, M., Baudet, V., Boissin, P., Boursier, E., Loriolle, F., y et al. (1991). The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J Biol Chem* **266**(24), 15771-81.
- Traub, L. M., y Lukacs, G. L. (2007). Decoding ubiquitin sorting signals for clathrin-dependent endocytosis by CLASPs. *J Cell Sci* **120**(Pt 4), 543-53.
- Triantafilou, K., y Triantafilou, M. (2003). Lipid raft microdomains: key sites for Coxsackievirus A9 infectious cycle. *Virology* **317**(1), 128-35.
- Triantafilou, K., y Triantafilou, M. (2004). Lipid-raft-dependent Coxsackievirus B4 internalization and rapid targeting to the Golgi. *Virology* **326**(1), 6-19.

Bibliografía

- Tully, D. C., y Fares, M. A. (2008). The tale of a modern animal plague: Tracing the evolutionary history and determining the time-scale for foot and mouth disease virus. *Virology*.
- Twomey, T., France, L. L., Hassard, S., Burrage, T. G., Newman, J. F., y Brown, F. (1995). Characterization of an acid-resistant mutant of foot-and-mouth disease virus. *Virology* **206**(1), 69-75.
- Ungewickell, E., y Branton, D. (1981). Assembly units of clathrin coats. *Nature* **289**(5796), 420-2.
- Upla, P., Marjomäki, V., Kankaanpää, P., Ivaska, J., Hyypiä, T., Van Der Goot, F. G., y Heino, J. (2004). Clustering induces a lateral redistribution of alpha 2 beta 1 integrin from membrane rafts to caveolae and subsequent protein kinase C-dependent internalization. *Mol Biol Cell* **15**(2), 625-36.
- Urs, N. M., Jones, K. T., Salo, P. D., Severin, J. E., Trejo, J., y Radhakrishna, H. (2005). A requirement for membrane cholesterol in the beta-arrestin- and clathrin-dependent endocytosis of LPA1 lysophosphatidic acid receptors. *J Cell Sci* **118**(Pt 22), 5291-304.
- Vakharia, V. N., Devaney, M. A., Moore, D. M., Dunn, J. J., y Grubman, M. J. (1987). Proteolytic processing of foot-and-mouth disease virus polyproteins expressed in a cell-free system from clone-derived transcripts. *J Virol* **61**(10), 3199-207.
- van der Blik, A. M., y Meyerowitz, E. M. (1991). Dynamin-like protein encoded by the *Drosophila* shibire gene associated with vesicular traffic. *Nature* **351**(6325), 411-4.
- Van Hamme, E., Dewerchin, H. L., Cornelissen, E., Verhasselt, B., y Nauwynck, H. J. (2008). Clathrin- and caveolae-independent entry of feline infectious peritonitis virus in monocytes depends on dynamin. *J Gen Virol* **89**(Pt 9), 2147-56.
- van Kuppeveld, F. J., Hoenderop, J. G., Smeets, R. L., Willems, P. H., Dijkman, H. B., Galama, J. M., y Melchers, W. J. (1997). Coxsackievirus protein 2B modifies endoplasmic reticulum membrane and plasma membrane permeability and facilitates virus release. *Embo J* **16**(12), 3519-32.
- van Ooij, M. J., Vogt, D. A., Paul, A., Castro, C., Kuijpers, J., van Kuppeveld, F. J., Cameron, C. E., Wimmer, E., Andino, R., y Melchers, W. J. (2006). Structural and functional characterization of the coxsackievirus B3 CRE(2C): role of CRE(2C) in negative- and positive-strand RNA synthesis. *J Gen Virol* **87**(Pt 1), 103-13.
- van Vlijmen, H. W., Curry, S., Schaefer, M., y Karplus, M. (1998). Titration calculations of foot-and-mouth disease virus capsids and their stabilities as a function of pH. *J Mol Biol* **275**(2), 295-308.
- Vela, E. M., Colpitts, T. M., Zhang, L., Davey, R. A., y Aronson, J. F. (2008). Pichindé virus is trafficked through a dynamin 2 endocytic pathway that is dependent on cellular Rab5- and Rab7-mediated endosomes. *Arch Virol* **153**(7), 1391-6.
- Vela, E. M., Zhang, L., Colpitts, T. M., Davey, R. A., y Aronson, J. F. (2007). Arenavirus entry occurs through a cholesterol-dependent, non-caveolar, clathrin-mediated endocytic mechanism. *Virology* **369**(1), 1-11.
- Verdaguer, N., Jiménez-Clavero, M. A., Fita, I., y Ley, V. (2003). Structure of swine vesicular disease virus: mapping of changes occurring during adaptation of human coxsackie B5 virus to infect swine. *J Virol* **77**(18), 9780-9.
- Vidricaire, G., y Tremblay, M. J. (2007). A clathrin, caveolae, and dynamin-independent endocytic pathway requiring free membrane cholesterol drives HIV-1 internalization and infection in polarized trophoblastic cells. *J Mol Biol* **368**(5), 1267-83.
- Vonderheit, A., y Helenius, A. (2005). Rab7 associates with early endosomes to mediate sorting and transport of Semliki forest virus to late endosomes. *PLoS Biol* **3**(7), e233.

- Wang, H., Yang, P., Liu, K., Guo, F., Zhang, Y., Zhang, G., y Jiang, C. (2008). SARS coronavirus entry into host cells through a novel clathrin- and caveolae-independent endocytic pathway. *Cell Res* **18**(2), 290-301.
- Wang, L. H., Rothberg, K. G., y Anderson, R. G. (1993). Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. *J Cell Biol* **123**(5), 1107-17.
- Warren, R. A., Green, F. A., Stenberg, P. E., y Enns, C. A. (1998). Distinct saturable pathways for the endocytosis of different tyrosine motifs. *J Biol Chem* **273**(27), 17056-63.
- Wary, K. K., Mainiero, F., Isakoff, S. J., Marcantonio, E. E., y Giancotti, F. G. (1996). The adaptor protein Shc couples a class of integrins to the control of cell cycle progression. *Cell* **87**(4), 733-43.
- Wary, K. K., Mariotti, A., Zurzolo, C., y Giancotti, F. G. (1998). A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth. *Cell* **94**(5), 625-34.
- Way, M., y Parton, R. G. (1995). M-caveolin, a muscle-specific caveolin-related protein. *FEBS Lett* **376**(1-2), 108-12.
- Weissenhorn, W., Hinz, A., y Gaudin, Y. (2007). Virus membrane fusion. *FEBS Lett* **581**(11), 2150-5.
- Wessels, E., Duijsings, D., Lanke, K. H., van Dooren, S. H., Jackson, C. L., Melchers, W. J., y van Kuppeveld, F. J. (2006a). Effects of picornavirus 3A proteins on protein transport and GBF1-dependent COP-I recruitment. *J Virol*.
- Wessels, E., Duijsings, D., Niu, T. K., Neumann, S., Oorschot, V. M., de Lange, F., Lanke, K. H., Klumperman, J., Henke, A., Jackson, C. L., Melchers, W. J., y van Kuppeveld, F. J. (2006b). A viral protein that blocks Arf1-mediated COP-I assembly by inhibiting the guanine nucleotide exchange factor GBF1. *Dev Cell* **11**(2), 191-201.
- Wessels, E., Duijsings, D., Notebaart, R. A., Melchers, W. J., y van Kuppeveld, F. J. (2005). A proline-rich region in the coxsackievirus 3A protein is required for the protein to inhibit endoplasmic reticulum-to-golgi transport. *J Virol* **79**(8), 5163-73.
- Wettestad, F. R., Hawkins, S. F., Stewart, A., Luzio, J. P., Howard, J. C., y Jackson, A. P. (2002). Controlled elimination of clathrin heavy-chain expression in DT40 lymphocytes. *Science* **297**(5586), 1521-5.
- Whitton, J. L., Cornell, C. T., y Feuer, R. (2005). Host and virus determinants of picornavirus pathogenesis and tropism. *Nat Rev Microbiol* **3**(10), 765-76.
- Willingmann, P., Barnert, H., Zeichhardt, H., y Habermehl, K. O. (1989). Recovery of structurally intact and infectious poliovirus type 1 from HeLa cells during receptor-mediated endocytosis. *Virology* **168**(2), 417-20.
- Wong, J., Zhang, J., Si, X., Gao, G., Mao, I., McManus, B. M., y Luo, H. (2008). Autophagosome supports coxsackievirus B3 replication in host cells. *J Virol* **82**(18), 9143-53.
- Wymann, M. P., Bulgarelli-Leva, G., Zvelebil, M. J., Pirola, L., Vanhaesebroeck, B., Waterfield, M. D., y Panayotou, G. (1996). Wortmannin inactivates phosphoinositide 3-kinase by covalent modification of Lys-802, a residue involved in the phosphate transfer reaction. *Mol Cell Biol* **16**(4), 1722-33.
- Yamada, E. (1955). The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *J Biophys Biochem Cytol* **1**(5), 445-58.
- Yamashiro, D. J., Fluss, S. R., y Maxfield, F. R. (1983). Acidification of endocytic vesicles by an ATP-dependent proton pump. *J Cell Biol* **97**(3), 929-34.
- Yamashiro, D. J., y Maxfield, F. R. (1984). Acidification of endocytic compartments and the intracellular pathways of ligands and receptors. *J Cell Biochem* **26**(4), 231-46.

Bibliografía

- Yamashiro, D. J., Tycko, B., Fluss, S. R., y Maxfield, F. R. (1984). Segregation of transferrin to a mildly acidic (pH 6.5) para-Golgi compartment in the recycling pathway. *Cell* **37**(3), 789-800.
- Yoon, S. Y., Ha, Y. E., Choi, J. E., Ahn, J., Lee, H., Kweon, H. S., Lee, J. Y., y Kim, D. H. (2008). Coxsackievirus B4 uses autophagy for replication after calpain activation in rat primary neurons. *J Virol* **82**(23), 11976-8.
- Zaragoza, C., Saura, M., Padalko, E. Y., López-Rivera, E., Lizarbe, T. R., Lamas, S., y Lowenstein, C. J. (2006). Viral protease cleavage of inhibitor of kappaBalpha triggers host cell apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(50), 19051-6.
- Zautner, A. E., Jahn, B., Hammerschmidt, E., Wutzler, P., y Schmidtke, M. (2006). N- and 6-O-sulfated heparan sulfates mediate internalization of coxsackievirus B3 variant PD into CHO-K1 cells. *J Virol* **80**(13), 6629-36.
- Zhang, G., Haydon, D. T., Knowles, N. J., y McCauley, J. W. (1999). Molecular evolution of swine vesicular disease virus. *J Gen Virol* **80** (Pt 3), 639-51.
- Zhang, G., Wilsden, G., Knowles, N. J., y McCauley, J. W. (1993). Complete nucleotide sequence of a coxsackie B5 virus and its relationship to swine vesicular disease virus. *J Gen Virol* **74** (Pt 5), 845-53.
- Zhao, Q., Pacheco, J. M., y Mason, P. W. (2003). Evaluation of genetically engineered derivatives of a Chinese strain of foot-and-mouth disease virus reveals a novel cell-binding site which functions in cell culture and in animals. *J Virol* **77**(5), 3269-80.
- Zidovetzki, R., y Levitan, I. (2007). Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies. *Biochim Biophys Acta* **1768**(6), 1311-24.

Anexos

Differential distribution of non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus in BHK-21 cells

Mercedes García-Briones^{a,b}, María F. Rosas^a, Mónica González-Magaldi^a,
Miguel A. Martín-Acebes^a, Francisco Sobrino^{a,b,*}, Rosario Armas-Portela^{a,c,*}

^a Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM), Spain

^b Centro de Investigación en Sanidad Animal, INIA, Valdeolmos, 28130 Madrid, Spain

^c Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

Received 14 November 2005; returned to author for revision 13 December 2005; accepted 28 February 2006

Available online 19 April 2006

Abstract

Differences in the kinetics of expression and cell distribution among FMDV non-structural proteins (NSPs) have been observed in BHK-21-infected cells. 3D^{pol} was the first protein detected by immunofluorescence (1.5 h p.i.), showing a perinuclear distribution. At 2–2.5 h p.i., 2B, 2C, 3B and 3C were detected, mostly exhibiting a punctuated, scattered pattern, while 3A and 3D^{pol} appeared concentrated at one side of the nucleus. This distribution was exhibited by all the NSPs from 3 h p.i., being 2C and, to a lesser extent, precursors 2BC and 3ABBB, the only proteins detected by Western blotting at that infection time. From 4 h p.i., all mature NSPs as well as precursors 2BC, 3ABBB, 3ABB, 3AB and 3CD^{pol} were detected by this technique. In spite of their similar immunofluorescence patterns, 2C and 3A co-localized partially by confocal microscopy at 3.5 h p.i., and 3A, but not 2C, co-localized with the ER marker calreticulin, suggesting differences in the distribution of these proteins and/or their precursors as infection proceeded. Transient expression of 2C and 3AB resulted in punctuated fluorescence patterns similar to those found in early infected cells, while 3A showed a more diffuse distribution. A shift towards a fibrous pattern was noticed for 3ABB, while a major change was observed in cells expressing 3ABBB, which displayed a perinuclear fibrous distribution. Interestingly, when co-expressed with 3D^{pol}, the pattern observed for 3ABBB fluorescence was altered, resembling that exhibited by cells transfected with 3AB. Transient expression of 3D^{pol} showed a homogeneous cell distribution that included, as determined by confocal microscopy, the nucleus. This was confirmed by the detection of 3D^{pol} in nuclear fractions of transfected cells. 3D^{pol} and its precursor 3CD^{pol} were also detected in nuclear fractions of infected cells, suggesting that these proteins can directly interact with the nucleus during FMDV infection.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: FMDV; Non-structural proteins; Subcellular distribution; Infection; Transient expression

Introduction

Foot-and-mouth disease virus (FMDV), an aphthovirus that belongs to the Picornaviridae family, is the causative agent of one of the most economically damaging animal diseases (Bachrach, 1977; Domingo et al., 1990; Pereira, 1981; Sobrino et al., 2001). FMD affects domestic and wild artiodactyls, mainly cattle, swine, goats and sheep, producing a typical

vesicular disease (Burrows et al., 1981). FMDV genome consists of a positive-sense RNA molecule of approximately 8500 nucleotides that encodes a unique polypeptide, which is processed in infected cells to yield different polypeptide precursors and the mature viral proteins (Belsham, 2005). Replication and translation of FMDV RNA occur in the cytoplasm (Arlinghaus and Polatnick, 1969) and for certain Picornaviruses its capacity to replicate in enucleated infected cells has been reported (Follett et al., 1975). FMDV polypeptide synthesis can initiate at two in frame AUG codons (Beck et al., 1983) following ribosome recognition of the adjacent internal ribosome entry site (IRES) region (Belsham, 2004; Martinez-Salas, 1999). The open reading frame of FMDV sequentially

* Corresponding authors. Mailing address: CBMSO, Cantoblanco 28049, Madrid, Spain. Fax: +34 91 4978087.

E-mail addresses: fsobrino@cbm.uam.es (F. Sobrino), rarmas@cbm.uam.es (R. Armas-Portela).

encodes a viral protease (L), the capsid or structural proteins, and a total of nine additional mature, non-structural proteins (NSPs). Enzymatic activities have been identified for proteases L, 2A and 3C, the latter responsible for most of the proteolytic processing of the viral polyprotein (Ryan et al., 2004), and for 3D^{pol}, the virus-encoded RNA-dependent RNA polymerase (Newman et al., 1979).

The analysis of interactions of NSPs with cell structures in the context of FMDV infection is limited by the detection sensitivity of the specific antibodies available, as well as by the complexity of the virus–cell interactions occurred during viral cycle. Transient expression has provided a good tool to achieve information on the functional role of these proteins and has been extensively used to study Picornavirus cell interactions (Cho et al., 1994; Egger et al., 2000; Moffat et al., 2005; O'Donnell et al., 2001; Sandoval and Carrasco, 1997; Towner et al., 1996).

In other Picornaviruses, such as poliovirus, each of the equivalent NSPs and most of their precursors are known to be involved in multiple functions needed for RNA replication, particle formation and viral pathogenesis (Andino et al., 1999; Choe et al., 2005; Porter, 1993; Whitton et al., 2005). Thus, rearrangements of the host cell membranes to generate vesicular structures associated to genomic RNA replication have been reported (Bienz et al., 1987; Gazina et al., 2002; Gosert et al., 2000) and proteins 2B, 2BC, 2C and 3A are involved in these interactions (Aldabe and Carrasco, 1995; Cho et al., 1994; Towner et al., 1996).

FMDV proteins 2B, 2C and 3A are predicted to contain hydrophobic domains (Forss et al., 1984) and have been recently found associated to crude membrane extracts in infected cultured cells (Moffat et al., 2005). The genomic organization of the region encoding FMDV proteins 3A and 3B is unique among the Picornaviridae family in that 3A extends its carboxy-terminus in at least 60 amino acid residues in length. Mutations in this protein are associated with modifications of the virus host range (Beard and Mason, 2000; Nunez et al., 2001). In addition, three non-identical copies of 3B are encoded and expressed in susceptible cells, and deletions of redundant copies lead to a decrease in replication efficiency in cell culture (Falk et al., 1992) and attenuation in pigs (Pacheco et al., 2003). It has been recently shown that 3D can uridylylate *in vitro* the three copies of 3B (Nayak et al., 2005), an initial step required to initiate replication of positive-sense genomic RNA in Picornavirus (reviewed in Andino et al. (1999)). In poliovirus, 3AB has a non-specific RNA-binding activity and associates with the cloverleaf structure in the 5' end of viral RNA and with precursor 3CD to form a ribonucleoprotein complex required for poliovirus RNA synthesis (Hope et al., 1997; Lama et al., 1994; Xiang et al., 1995, 1998).

Specific membrane rearrangements induced by FMDV in infected cells have been recently reported, such as its insensitivity to brefeldin A (O'Donnell et al., 2001). This drug blocks the function of ADP ribosylation factor 1 (ARF1) that is necessary for COPI-coated vesicle formation and disrupts the Golgi complex (Jackson and Casanova, 2000; Klausner et al., 1992). A collapse of cell organelles at one side of the cells (Monaghan et al., 2004) and the lack of ER or Golgi markers in

the infection-recruited membranes (Knox et al., 2005) have also been reported as differential effects of FMDV infection. In poliovirus and coxsackievirus, 3A, but not 3AB, is responsible of the inhibition of the anterograde traffic between the ER and the Golgi (Doedens et al., 1997), resulting in a reduction of the secretion of proteins such as MHC class I molecules (Choe et al., 2005), which is observed during Picornavirus infection (Deitz et al., 2000; Sanz-Parra et al., 1998). This mechanism could contribute to the evasion of the host immune system. Recent results with FMDV indicate that transient expression of 2BC, but not of 3A, inhibits host protein secretion in Vero cells (Moffat et al., 2005).

Host membrane recruitment to form the replication complex in Picornaviruses can involve components from different membrane compartments (Schlegel et al., 1996; Suhy et al., 2000). Early-induced vesicles by poliovirus infection are mostly recruited from ER-derived membranes (Bienz et al., 1987), while markers from other organelles, such as the Golgi and lysosomes, can be found in vesicles formed at later stages of infection (Bolten et al., 1998).

Despite of the information available, much remains to be understood on the detailed intracellular distribution of the FMDV NSPs precursors and mature proteins during the infection cycle and its relationship with the mechanism contributing to FMDV replication and pathogenesis. As a first step to address the functional role of the FMDV NSPs, we have analyzed the kinetics of detection and intracellular location of viral proteins 2B, 2C, 3A, 3B, 3C and 3D^{pol}, and their precursors, in BHK-21 cells. This cell line has been widely used for basic FMDV studies, as well as for diagnostic assays and production of vaccine antigens (Barteling, 2004; Brown, 1998). This study has revealed differences in their early kinetics of expression and in the immunofluorescence patterns that NSPs display in infected cells. In addition, transient expression of single FMDV NSP products has provided evidences of distinct interactions of proteins 3D^{pol}, 3A, 3AB, 3ABB and 3ABBB with host cell components.

Results

Expression and subcellular distribution of NSPs in FMDV-infected cells

The kinetics of NSPs expression in BHK-21-infected cells was first analyzed by Western blotting of cell extracts collected at different times upon infection, using specific antibodies to 2C, 3A, 3B, 3C and 3D^{pol} proteins. Detection of 2B expression was not possible as the serum available for this protein did not work in this assay. An MAbs specific to capsid protein VP1 was also included in this analysis (Fig. 1A). The earliest protein detected (2.5 h p.i.) was 2C. A band corresponding to VP1 and faint bands corresponding to precursors P1, 2BC and 3ABBB (the latter with the anti 3B antibody) were observed at 3 h p.i. All the mature proteins analyzed were clearly observed at 4 h p.i., as well as precursors 2BC, 3ABBB, 3ABB, 3AB, and P1. Due to its similar size, 3A and 3AB co-migrated in the gel revealed with the antibody to 3A shown in Fig. 1A; however, the two proteins

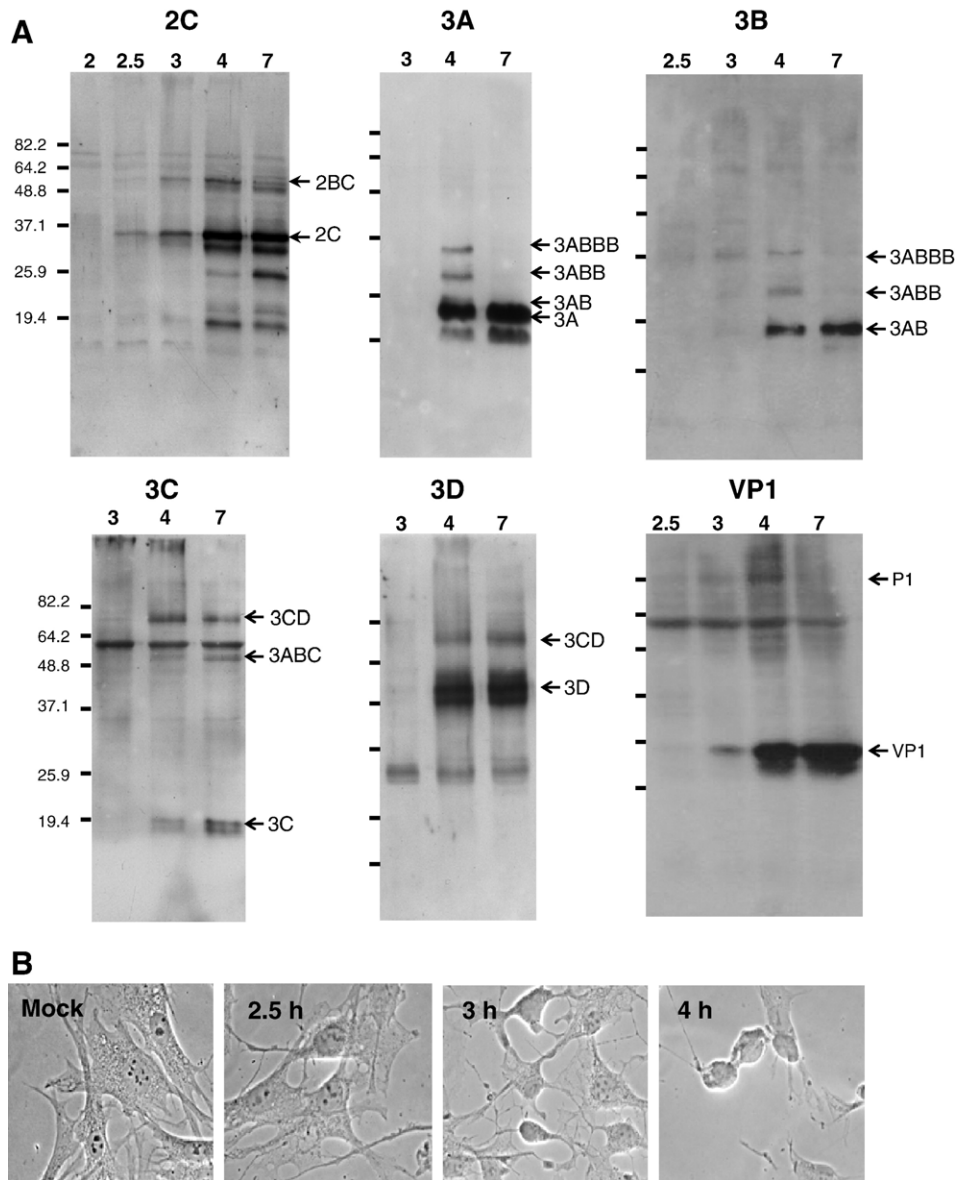


Fig. 1. Kinetics of FMDV infection in BHK-21 cells. (A) Western blot assays of cells collected at different times p.i. using antibodies to each of the viral proteins indicated. The migration of the markers and their molecular weight are indicated. Arrows point to the protein bands corresponding to the different FMDV proteins and their major precursors, according to Belsham (2004) and Toja et al. (1999). The predicted sizes (in kDa) of the FMDV proteins identified were: 52.7 (2BC), 35.8 (2C), 17.4 (3A), 20.1 (3AB), 22.7 (3ABB), 25.3 (3ABBB), 3ABC (47.4) 22.1 (3C), 75.7 (3CD^{pol}), 52.7 (3D^{pol}), 81 (P1), 22.9 (VP1). The mobility observed for 3A, 3AB, 3ABB and 3ABBB was slightly lower than that predicted, as also reported for other FMDV serotypes (O'Donnell et al., 2001). Doublets observed for 3D and VP1 could result from incomplete reduction of these proteins. The specific antibodies used are described in Materials and methods (MAb 1C8 and 2C2 were used for 2C and 3A detection, respectively). (B) Morphological alterations induced in infected cells at different times p.i., as determined by contrast-phase microscopy.

could be resolved using a higher polyacrylamide concentration (data not shown). By 7 h p.i., all mature proteins were detected as well as precursors 2BC, 3AB, 3ABC and 3CD and a protein band of a size corresponding to 3ABC was observed with the antibody to 3C. Antibodies to 2C and 3A also revealed the presence of protein bands of a size lower than expected at 4 and 7 h p.i. These products could result from proteolysis of these proteins and/or its precursors.

Accumulation of FMDV proteins correlated with the emergence of morphological signs of cytopathic effect in infected cells observed by contrast-phase microscopy. Progress of morphological alterations was not synchronic, and cells with

different degrees of alteration could be observed during infection. In average, cells started losing their characteristic morphology by 3 h p.i., turning by 4 h p.i. into rounded cells that became progressively detached from the plates (Fig. 1B).

A parallel analysis by immunofluorescence microscopy revealed differences in the temporal distribution of these proteins and their processing precursors in infected cells (Fig. 2). Specific 3D^{pol} immunostaining was detected, mostly showing a perinuclear distribution, as soon as 1.5 h p.i. From 2 h p.i., 3D^{pol} appeared concentrated at one side of the nucleus. Fluorescence of antibodies to VP1, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C and their precursors was only observed from 2 to 2.5 h p.i. Immunostaining to 3A

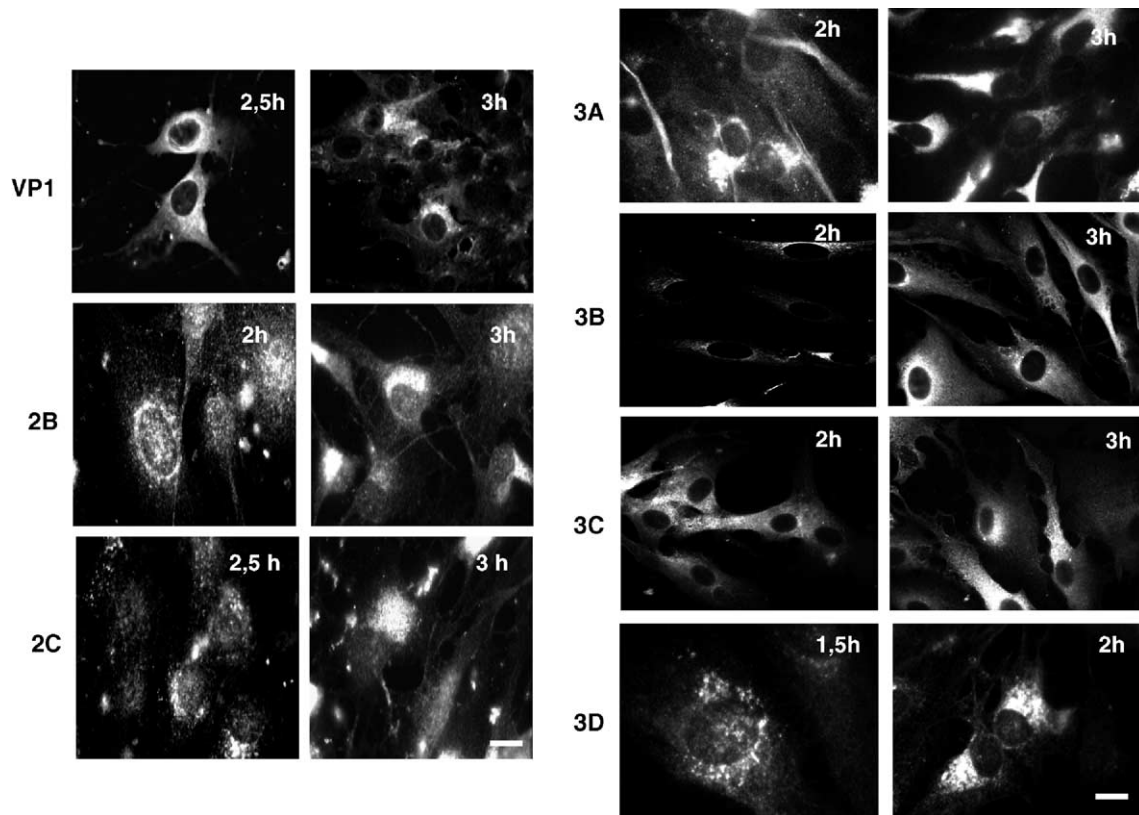


Fig. 2. Distribution of FMDV NSPs in BHK-21 cells at different times after infection. Infected cells were processed for immunofluorescence staining as described in Materials and methods. The following MAb and rabbit specific sera were used as primary antibodies: VP1 (SD6), DM21 (2B), E39 (2C), 2C2 (3A), IF8 (3B), 2D2 (3C) and E56 (3D). Alexa Fluor 488 anti-rabbit and Alexa Fluor 594 anti-mouse antibodies were used as secondary antibodies to detect rabbit sera and MAbs, respectively. Scale bar, 10 μ m.

showed a juxtannuclear distribution at 2 h p.i., similar to that of 3D^{pol} at this time of infection. Conversely, VP1, 2B, 2C and 3C mostly exhibited a punctuated and scattered pattern.

As infection proceeded (3 h p.i.), fluorescence to all the proteins analyzed accumulated in a juxtannuclear region that resembled that exhibited at earlier times (2 h p.i.) by 3D^{pol} and 3A (Fig. 2), probably reflecting their association to the replication complex. By 3 h p.i., a significant fraction of infected cells had already developed morphological alterations, as judged by contrast-phase microscopy (Fig. 1B).

In spite of their similar immunofluorescence patterns, differences in the distribution of 2C and 3A could be observed from 3.5 h p.i. by double labeling and confocal microscopy. Staining to antibodies E12 (3A) and 1C8 (2C) exhibited a similar bright pattern in most of the cells. However, the merge image revealed an incomplete co-localization of these proteins (Fig. 3A). This was confirmed by confocal image analyses using Metamorph co-localization menu, which rendered a correlation value of 0.60 ± 0.02 . Interestingly, around 10% of infected cells mainly showed fluorescence to either 3A or 2C. In this case, lower correlation values (0.3) were obtained. These results suggest differences in the kinetics of accumulation and the intracellular location between these two proteins during the infection progress.

The involvement of 2C and 3A in interactions with cell membranes described for FMDV and other Picornaviruses led

us to study a possible co-localization of these NSPs with ER or the Golgi markers. By using a rabbit antibody against calnexin, an ER marker, a reticular fluorescence pattern distributed throughout the cytoplasm was noticed, and no evidences of co-localization with proteins 3A (Fig. 3A) and 2C (data not shown) were observed by confocal microscopy of infected cells. Fluorescence to a different ER marker, calreticulin, appeared distributed with a more diffuse pattern and showed a partial co-localization (0.64 ± 11) with that of 3A, while no co-localization was observed with protein 2C (Fig. 3B). On the other hand, double immunofluorescence using MAb to p58 K protein (an anti-Golgi stacks marker) showed a partial co-localization with 3A and 2C after 3.5 h of BHK-21 infection (Fig. 3C). The thickness of the sections required to detect fluorescence of MAb CC92 to the *cis*-Golgi network protein gp74 impaired a confocal analysis of its co-localization with the anti-FMDV 3A and 2C antibodies in infected cells. However, an alteration of the distribution pattern of gp74 was noticed in infected cells (Fig. 3D), indicating a relocation of this *cis*-Golgi protein during infection.

Subcellular distribution of single NSPs transiently expressed in BHK-21 cells

As a complementary approach to study the role of FMDV NSPs in cell pathogenesis, we analyzed their distribution and

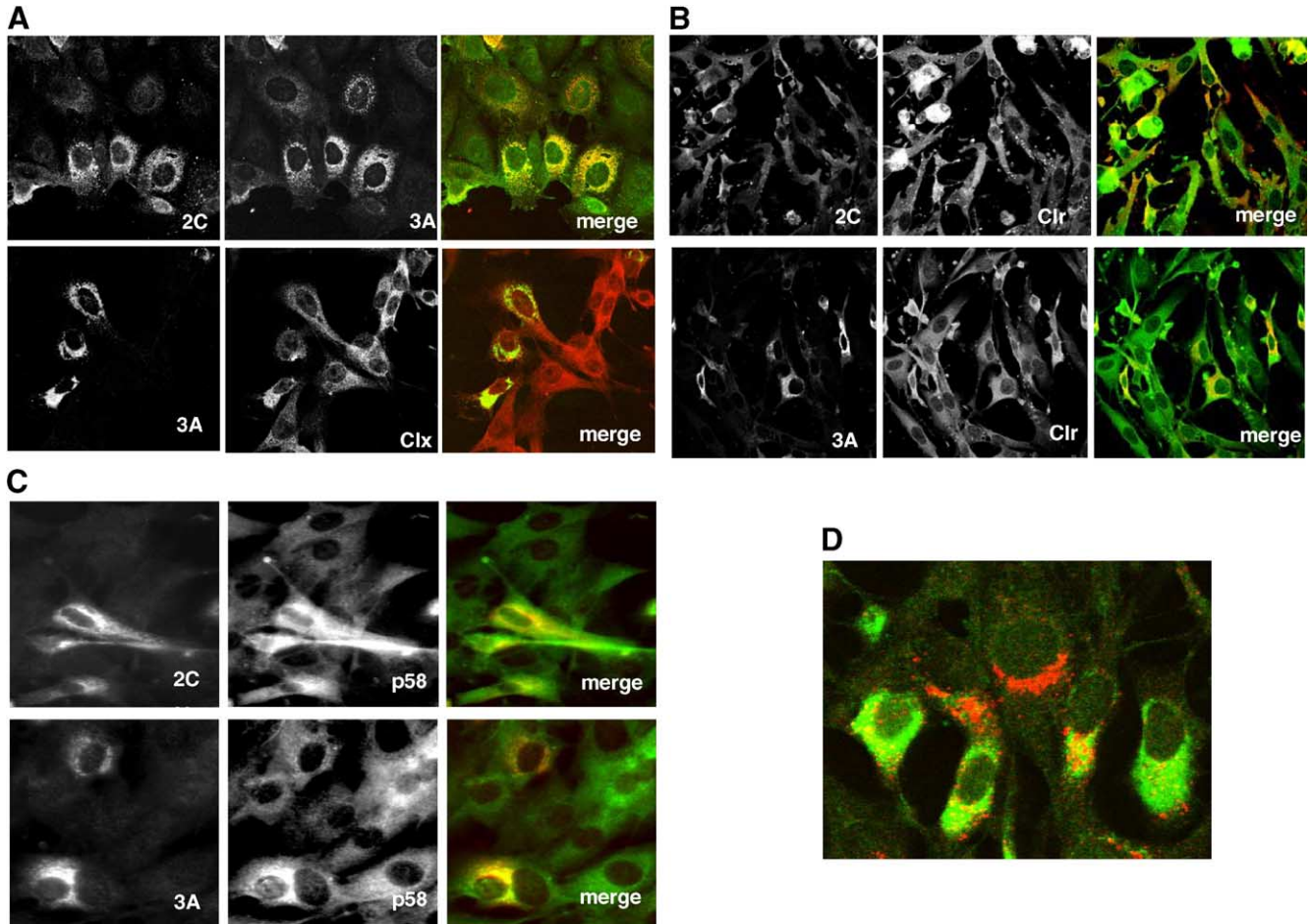


Fig. 3. Double immunofluorescence analysis of the distribution of 2C, 3A and ER or Golgi markers in BHK-21-infected cells. (A) Confocal images of partial co-localization of 2C and 3A revealed with MAb 1C8 and E12 rabbit serum (3A) (top) and of 3A and calnexin stained with MAb 2C2 and a rabbit anti-calnexin serum, respectively (clx, bottom). (B) Confocal images of co-localization of 2C and 3A and calreticulin (clr). MAbs 1C8 (2C) and 2C2 (3A) and a rabbit serum anti-calreticulin were used as primary antibodies. (C) Partial co-localization of 2C and 3A with Golgi stacks. Rabbit antisera E39 (2C) and E12 (3A) and MAb anti-p58 were used as primary antibodies. (D) Double immunofluorescence to 3A and the *cis*-Golgi network protein gp74 revealed with rabbit antiserum E12 and MAb CC92, respectively. The following secondary antibodies were used: A and C, Alexa 594 anti-rabbit (red) and Alexa 488 anti-mouse IgGs (green); B and D, Alexa 488 anti-rabbit (green) and Alexa 594 anti-mouse IgGs (red).

the cellular effects they produced when transiently expressed in BHK-21 cells from plasmid pRSV derivatives (see Materials and methods for details). Expression of 2B protein could not be detected at different times p.t. with plasmid pRSV-2B, neither by Western blotting nor by immunofluorescence. Transfection with pRSV-2C resulted in detectable levels of protein by Western blotting (data not shown), and cells exhibiting specific 2C fluorescence were observed at 24 and 48 h p.t. The rate of expressing cells was low (about 1%), as was the intensity of the fluorescence in positive cells, which showed a perinuclear distribution pattern (Fig. 4A). This pattern was similar to that observed for 2C at early times upon infection (Fig. 2). Cells positive to 2C showed an elongated morphology that impaired conclusive results in the analysis of the co-localization of 2C with PDI or the Golgi p58 protein.

About 10% of the cells transfected with pRSV-3A showed high levels of specific fluorescence at 24 h p.t., being these values lower at 48 h p.t. Expression of 3A was detected by Western blotting (Fig. 4B), and its fluorescence displayed a cytoplasmic diffuse pattern in most of the positive cells (Fig. 4A).

Since 3A precursors including one, two or the three non-identical copies of 3B proteins were found in FMDV-infected cells (see Fig. 1A), we analyzed the fluorescence pattern to 3A in cells transfected with pRSV-3AB, pRSV-3ABB or pRSV-3ABBB, whose expression levels, detected with an anti-3A MAb, were similar to that found in cells transfected with pRSV-3A (Fig. 4A). Expression of 3AB, a precursor found in infected cells at both early and late phases of infection (Fig. 1A), was distributed in a scattered punctuated fluorescence pattern (Fig. 4A), and a protein band of the expected size was observed by Western blotting (Fig. 4B). Double immunofluorescence experiments did not show co-localization with PDI or with Golgi p58, and no significant alterations in the distribution pattern of these cell proteins were observed in cells expressing 3A or 3AB (data not shown).

The fluorescence shown by cells expressing 3ABB appeared more compact, displayed a fibrous pattern and a protein band corresponding to this polypeptide was detected in cell extracts (Figs. 4A, B). Remarkably, expression of 3ABBB resulted in a different distribution that showed a fibrous and often perinuclear

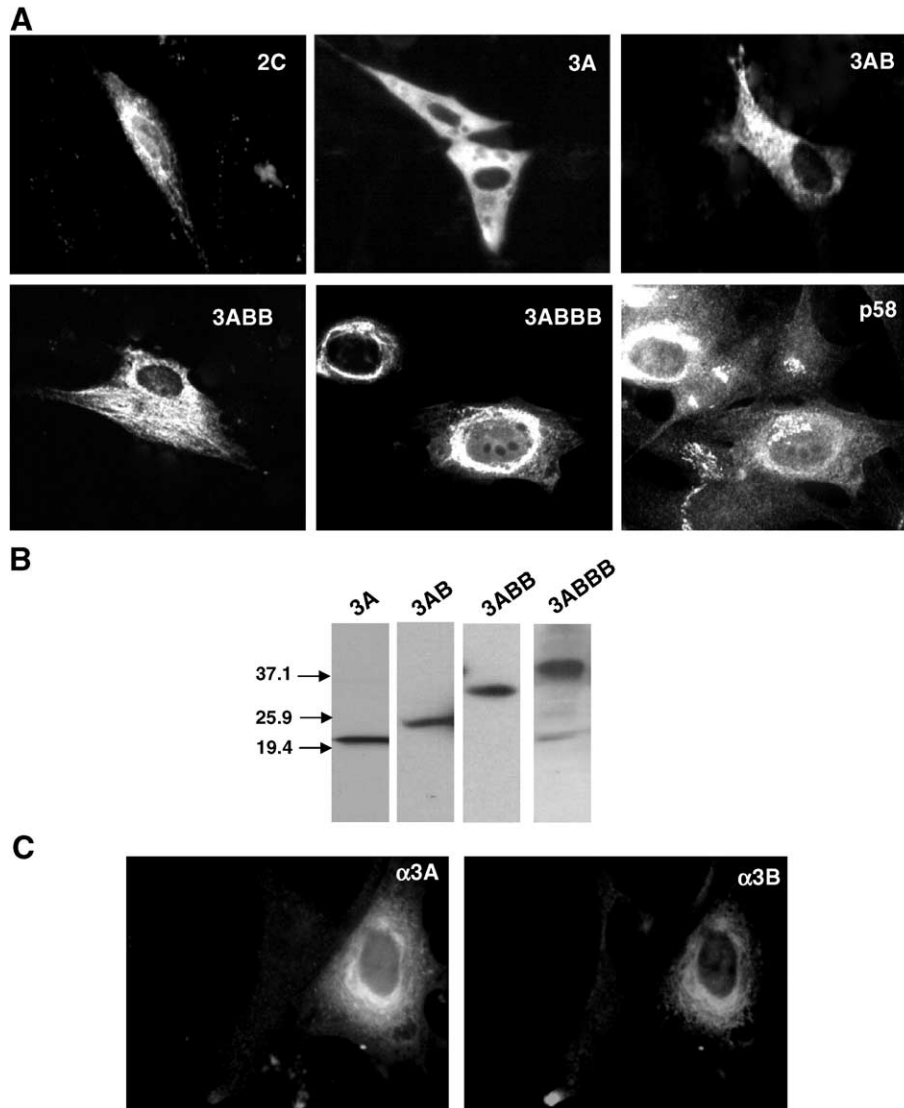


Fig. 4. Transient expression of different FMDV NSPs. BHK-21 cells were transfected with plasmids expressing the proteins indicated, as described in Materials and methods. Results correspond to 24 h p.t. In both immunofluorescence staining (A) or Western blotting (B), 2C expression was detected with MAb 1C8 and MAb 2C2 was used to evaluate the expression of 3A, 3AB, 3ABB and 3ABBB proteins. (C) Expression of 3A or 3B detected, in cells transfected with pRSV-3ABBB, by using rabbit antiserum E12 and MAb 1F8, respectively.

pattern (Fig. 4A). This distribution was maintained when an MAb to 3B (1F8) was used in the immunofluorescence assays (Fig. 4C). In this case, double immunofluorescence studies showed a partial co-localization of 3ABBB with p58 K (Fig. 4A) and no overlap with PDI (data not shown). When 3ABBB was detected in transfected cell extracts, a minor additional band corresponding to mature 3A was also observed (Fig. 4B), supporting a limited proteolytic processing of 3ABBB. The identity of this 3A band was confirmed as it was not recognized by MAb 1F8 to 3B. Processed 3A could also be observed in Western blots from cells transiently expressing 3ABB and 3AB, and the intensity of the band corresponding to mature 3A varied between experiments (data not shown). Further experiments, including other cell lines, are in progress to characterize this processing, which suggests that cellular proteases can cleave the 3B copies included in these precursors.

Transient expression of FMDV 3C was reported as toxic for BHK-21 cells (Martinez-Salas and Domingo, 1995), resulting in a very low number of viable cells; therefore, this protein was not included in our analysis.

Cells transfected with pRSV-3D showed a higher expression efficiency of about 30%. Fluorescence to 3D^{pol} was also more intense than that observed for the other FMDV polypeptides analyzed (Fig. 5A). Interestingly, 3D^{pol} staining was present all over the cytoplasm and in the nucleus. In these experiments, when double labeling to PDI and 3D^{pol} was performed, alterations in the ER could be observed in most of the 3D^{pol} expressing cells. Some transfected cells exhibited a more compact and bright ER fluorescence (Fig. 5A, a, c), whereas in cells exhibiting a more intense 3D^{pol} nuclear staining, a diffuse ER was frequently observed, including cells in which PDI staining was not detected (Fig. 5A, b, d). This result suggests

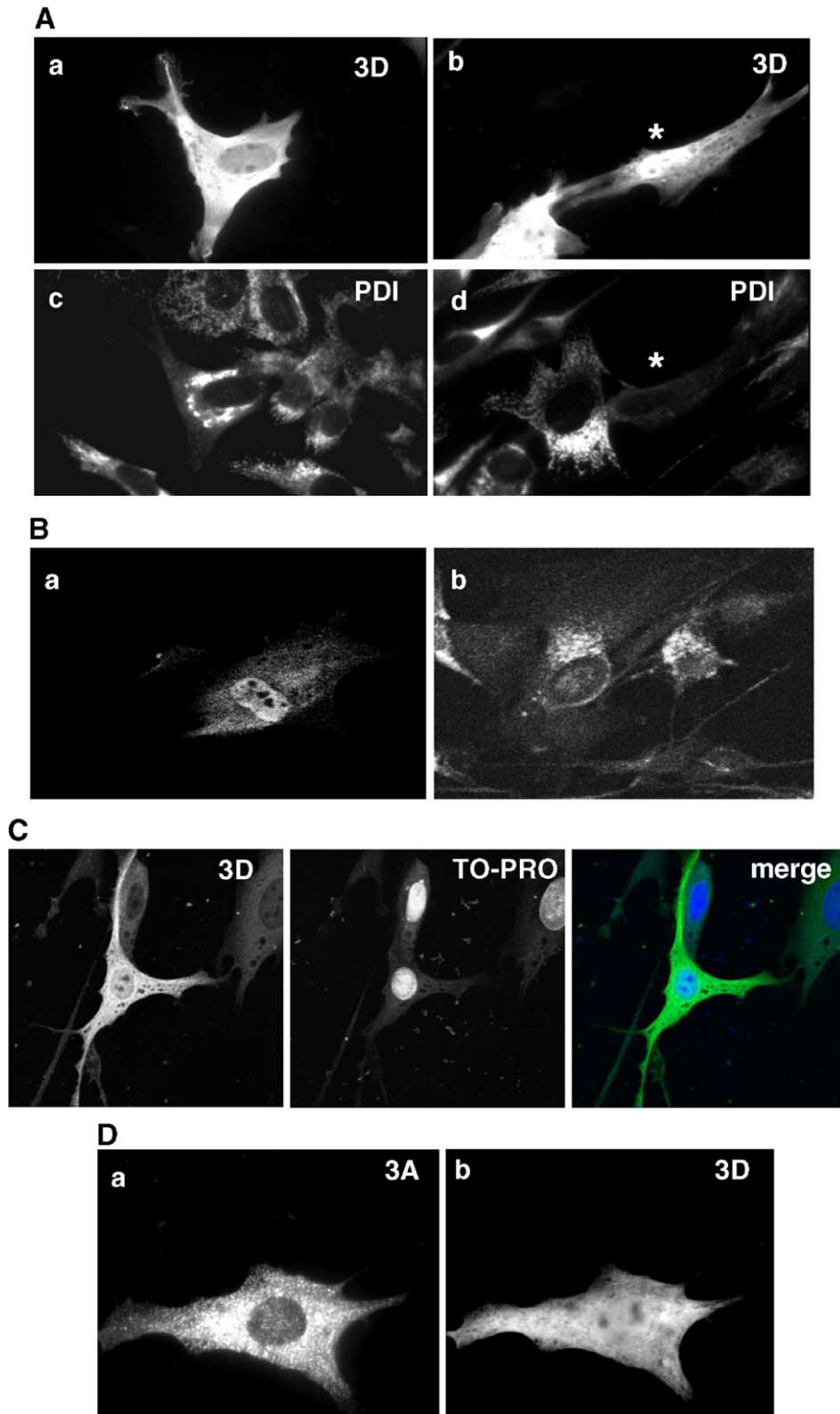


Fig. 5. Effects of expression of 3D in transfected and infected BHK-21 cells. (A) Double immunofluorescence to 3D^{pol} (E56) (a, b) and PDI (1D3) (c, d) in cells transfected with pRSV-3D; (*) denotes a cell with a high level of nuclear expression that showed a decrease in ER staining. (B) Immunostaining to 3D in confocal sections of cells transfected with pRSV-3D (a) or after 3.5 h of infection with FMDV (b). (C) Fluorescence to 3D^{pol}, nuclear staining with TO-PRO-3 and the merge image in cells transfected with p-RSV-3D. (D) Immunostaining to 3A and 3D in cells co-transfected with plasmids pRSV-3ABBB and pRSV-3D. Transfected cells were analyzed, in all cases, at 24 h p.t. Expression of 3D^{pol} and 3A was detected with rabbit serum E56 and MAb 2C2, respectively. In all cases, Alexa Fluor 488 anti-rabbit and Alexa Fluor 594 anti-mouse IgGs were used as secondary antibodies.

that ER disruption or rearrangements can take place in 3D^{pol} expressing cells.

Nuclear localization of 3D^{pol} was supported by confocal microscopy of BHK-21 cells transfected with pRSV-3D, in which this protein was detected in cell nucleus sections (Fig. 5B, a) and its fluorescence co-localized with that of a double-stranded nucleic acid stain (TO-PRO-3) (Fig. 5C). Interestingly, a similar analysis also showed the presence of 3D^{pol} in the nucleus of infected cells, albeit the levels of nuclear fluorescence detected were lower than those of transfected cells (Fig. 5B, b). Furthermore, both the cytoplasmic and the nuclear fractions from either FMDV-infected or pRSV-3D transfected BHK-21 cells contained 3D^{pol}, as estimated by a Western blot assay of these fractions using E56 serum to this protein (Fig. 6). The specificity of this cell fractionation was supported by the low amount of β II-tubulin detected in the nuclear fractions,

which could be due to the dragging of the centrosome during sedimentation. In this assay, an additional band corresponding to the expected size for precursor 3CD^{pol} (75.7 kDa) was detected in the nuclear fraction of infected cells (Fig. 6B). The specificity of this band was confirmed as it was also detected by MAb 2D2 to 3C (data not shown).

As mentioned in Introduction, interactions between 3AB and 3D^{pol} have been reported for poliovirus. Thus, we explored whether the 3ABBB fibrous pattern was maintained when co-expressed with 3D^{pol}. To this end, plasmids pRSV-3D and pRSV-3ABBB were used in co-transfection experiments for further immunofluorescence analysis using specific antibodies. Under these conditions, the pattern showed by 3D^{pol} was similar to that observed when individually expressed, while a noticeable change was observed for 3ABBB, which shifted from the fibrous and perinuclear pattern shown when expressed

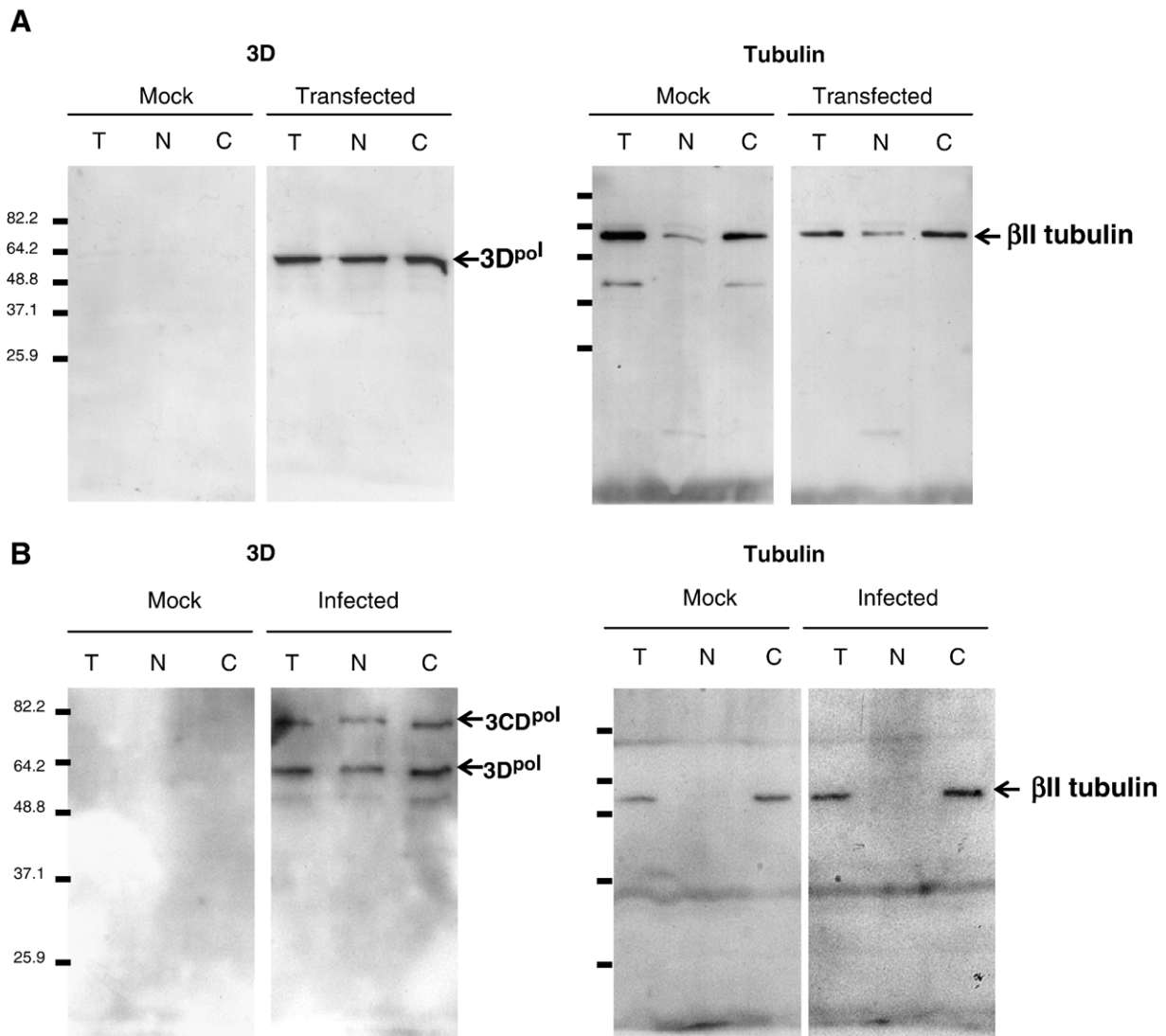


Fig. 6. Western blot analysis of cellular fractions. BHK-21 cells were either infected with C-S8c1 FMDV (A) or transfected with pRSV-3D (B). At 4 h p.i. or 24 h p.t., total cell extracts (T), cytoplasmic and cell membrane fraction (C) and nuclear fraction (N) were obtained (as described in Materials and methods) and assayed by Western blotting using the following antibodies to: 3D (E56) and β II-tubulin (cytoplasmic marker). The migration of the markers and their molecular weight are indicated. Arrows point to the bands corresponding to 3D^{pol}, 3CD^{pol} and β II-tubulin (50 kDa).

alone (see Fig. 4A), to a spotted pattern (Fig. 5D, a). Thus, when co-expressed, 3D^{pol} modifies the cellular distribution of 3ABBB.

Discussion

The analysis by immunofluorescence of the kinetics of expression and cell distribution of type C FMDV NSPs in infected cells indicates that, from 3 h p.i., fluorescence to 2B, 2C, 3A, 3B, 3C and 3D^{pol}, as well as to capsid protein VP1, appeared accumulated at one side of the nucleus, as reported for serotype O viruses (Knox et al., 2005; Monaghan et al., 2004; O'Donnell et al., 2001). This location pattern has been associated to the viral replication complex (Monaghan et al., 2004) as it is well established in other Picornaviruses such as poliovirus (Bienz et al., 1992). However, the partial co-localization of 2C and 3A observed at 3.5 h p.i. suggests that these NSPs can interact with different cell components at advanced stages of FMDV infection.

Detection of FMDV proteins by Western blotting during infection was delayed in time compared to that achieved by immunofluorescence, probably reflecting the asynchrony in the infection progress shown by individual cells and/or a lower sensitivity in this technique of the antibodies used. The earliest protein detected (2.5 h p.i.) was 2C, followed by 2BC, 3ABBB, P1 and VP1 at 3.5 h p.i. From 4 h p.i., all mature proteins analyzed were detected, as well as precursors 2BC, 3AB and 3CD (Fig. 1A).

The origin of the membranes generated at FMDV replication site is unclear (Knox et al., 2005). By electron microscopy, type O FMDV-infected BHK-38 cells showed independent virus-induced vesicles with a low proportion of double membranes (Monaghan et al., 2004), similar to those observed in type C FMDV-infected BHK-21 cells (García-Briones, unpublished results). Previous analyses of FMDV NSPs distribution by immunofluorescence focused on times beyond 3 h p.i., an infection stage in which cells have already developed clear morphological alterations (Monaghan et al., 2004). Protein 3A was reported to co-localize by conventional fluorescence microscopy with the ER marker calreticulin in bovine and porcine keratinocytes ex-vivo-infected with a type O virus (O'Donnell et al., 2001). At the other hand, no co-localization was found in confocal microscopy studies between 2C and markers from ER (ERp57 and ERGIC53) and Golgi (ManII) in CHO-K1 cells or markers of post-Golgi membranes in GMK cells, both infected with a different type O FMDV strain (Knox et al., 2005). Our results indicate that, as described by O'Donnell et al. (2001), 3A co-localizes by confocal microscopy with calreticulin but not with calnexin, while co-localization of 2C with these ER markers was not observed (Figs. 3A, B). On the other hand, 3A and 2C partially co-localize with the Golgi stacks marker p58, but not with the *cis*-Golgi network protein gp74 (Figs. 3C, D). Our observations, which could be related to the cell line used, suggest that, at advanced stages of infection, FMDV NSPs can associate to markers from different membrane compartments.

Interestingly, our results also suggest that NSPs can interact with different cell components during the early steps of FMDV

infection. This is probably required to take control of cell machinery and to recruit the cellular factors needed for the formation of the replication complex as it is observed at later stages of infection. Differences have been found in the kinetics and distribution of NSPs fluorescence in infected cells at early times post-infection (1.5–2.5 h p.i.). Specific 3D^{pol} immunostaining was detected as soon as 1.5 h pi, while the rest of NSPs and VP1 were detected only from 2 to 2.5 h p.i. (Fig. 2). This delay can be due to a higher sensitivity of the 3D^{pol} antiserum used, although differences such as protein accessibility and/or different local concentration cannot be excluded. At these early times of infection, VP1, 2B, 2C and 3C mostly exhibited a punctuated and scattered pattern, while immunostaining to 3A showed a perinuclear distribution similar to that of 3D^{pol} (2 h p.i.), which suggests that early interactions can be established between these two proteins.

Transient expression analyses in BHK-21 cells have revealed differences in the cellular distribution of some of the FMDV NSPs studied. The lack of detection of 2B upon transfection with pRSV-2B is likely to result from low levels of protein expression, probably due to cell toxicity. Thus, detection of 2B transient expression has been reported by using a modified 2B, including a tag motif (Moffat et al., 2005). Besides, the low levels of expression and the elongated morphology of cells transfected with 2C also suggest a detrimental effect of its expression on cell viability. In this case, the subcellular distribution observed for 2C (Fig. 4A) was similar to that displayed at early times post-infection (Fig. 2).

Higher levels of expression were detected by using an MAb to 3A in cells transfected with plasmids corresponding to the different products of the 3ABBB region. Expression of 3A resulted in a diffused and spotted pattern, similar to that shown by cells soon after infection (Fig. 2), which suggested the localization of 3A at small vesicles, as it has been reported for FMDV type O in BHK-21 and other cultured cells (Moffat et al., 2005; O'Donnell et al., 2001). No previous information was available, to our knowledge, on the cellular distribution of the remaining products from the FMDV 3AB region. Remarkably, our results indicate that sequential addition of protein B copies resulted in a relocation of 3A fluorescence that became progressively compact and fibrous. A typical vesicular pattern was clearly observed upon 3AB transfection, indicating that 3AB can become associated to cell vesicles. 3AB is the most abundant 3B-containing precursor in FMDV-infected cells (Fig. 1A) even at late times post-infection, as also found for type A and type O FMDV-infected cells (O'Donnell et al., 2001). This vesicular pattern shifted to a fibrous network in cells expressing 3ABB, being the change most evident in 3ABBB expressing cells (Fig. 4A), which exhibited a fibrous perinuclear distribution when visualized with antibodies to either 3A or 3B (Fig. 4C). The interactions leading to these different distributions remain to be determined. Experiments are in progress to analyze the cell distribution of transiently expressed 3B products as well as their effect in co-expression experiments with 3A. Double staining with Golgi p58 or PDI only revealed a partial co-localization of 3ABBB with the Golgi stacks; however, this co-localization was not observed for 3A and 3AB. In poliovirus,

expression of 3A alone inhibits ER to Golgi protein traffic (Doedens and Kirkegaard, 1995) and dramatically alters the ER structure (Doedens et al., 1997), an effect not observed when 3AB is expressed alone (Egger et al., 2000).

Cells transfected with 3D^{pol} showed the highest level of expression of all NSPs. 3D^{pol} was homogeneously distributed in the cell, including the nucleus, and induced partial reorganization of the ER, as estimated by the use of an anti-PDI antibody. A confocal analysis confirmed the nuclear localization of 3D^{pol} in transfected cells (Figs. 5B, C). This observation led us to perform a similar analysis in FMDV-infected cells that showed 3D^{pol} nuclear staining in the sections analyzed (Fig. 5B). The presence of 3D^{pol} in the nucleus was confirmed by its detection in the nuclear fraction of transfected and infected cells (Fig. 6). Ultrastructural modifications of the nuclear membrane have been recently described in FMDV-infected cells (Monaghan et al., 2004). Furthermore, nuclear location of NSPs, including precursors containing 3D^{pol}, has been recently reported for rhinovirus and encephalomyocarditis virus, suggesting that Picornaviruses can reprogram the cell nucleus as part of their replication cycle (Aminev et al., 2003; Amineva et al., 2004). These authors also identified a nuclear localization motif (PnKTKLnPS) near the N-terminus of 3D^{pol}. A similar sequence (MRKTKLnPT) is present at equivalent positions of FMDV 3D^{pol} sequences (residues 16–24) among a wide variety of FMDV isolates representing the seven serotypes (Carrillo et al., 2005), including the C-S8c1 isolate used in this study. In FMDV, histone H3 can be in vitro cleavage by 3C (Falk et al., 1990), a processing also reported in BHK-21 cells transiently expressing 3C (Tesar and Marquardt, 1990) and 3ABC (Capozzo et al., 2002). Our results indicate that a protein band corresponding to 3CD^{pol} is also present, with a weaker intensity than that of 3D^{pol}, in nuclear fractions of infected cells (Fig. 6). Translocation of 3CD^{pol} to the nucleus might favor and/or modulate 3C nuclear activity in FMDV-infected cells. To our knowledge, these results are the first evidences of nuclear localization of FMDV proteins and experiments are in progress to understand their functional implications in FMDV replication.

Co-expression with 3D^{pol} modified the distribution of 3ABBB that shifts to a pattern similar to that observed in cells expressing 3AB (Fig. 5D). Interactions between 3A and 3D^{pol} are suggested by their common fluorescence pattern observed early upon infection (Fig. 2). However, further work is required to establish the protein regions involved in this relocation of 3ABBB and whether it is mediated by an interaction with 3D^{pol}, as that reported in poliovirus (Lama et al., 1994; Xiang et al., 1995) or by cell modifications induced by this protein in transfected cells.

Materials and methods

Cells and viruses

BHK-21 cells (ATCC) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco-BRL) supplemented with 5% fetal bovine serum (Gibco-BRL), 2 mM L-

glutamine, 1 µg/ml streptomycin and 1 µg/ml penicillin. Cells from passages 10–20 were infected with the type C FMDV isolate, C-S8c1 (Sobrinho et al., 1986).

Construction of plasmids

Plasmids for transient expression were derived from plasmid pRSV/L (de Wet et al., 1987) in which the luciferase gene was replaced by each of the following NSPs coding sequences: 2B, 2C, 3A, 3AB, 3ABB, 3ABBB and 3D^{pol}. Each of these sequences was amplified by PCR from either FMDV C-S8c1 RNA or plasmid MT15 (Toja et al., 1999), using the primers detailed in Table 1, which included restriction sites for cloning into plasmid pRSV/L. Integrity of all PCR-amplified regions within the recombinant vectors was confirmed by nucleotide sequencing.

Virus infections and cell transfections

BHK-21 confluent cells were infected with a multiplicity of infection (m.o.i) of 10 PFU/cell. After 1 h of virus adsorption, which was considered as 1 h post-infection (p.i.), cells were washed and the infection allowed proceeding in fresh medium. Subconfluent monolayers of cells grown on 10 mm Ø glass

Table 1
Oligonucleotides used for PCR amplification of NSPs sequences

Oligonucleotide ^a	Sequence (5'-3') ^b
2B-1	<u>ATACCCGGGTCTAGAAATGCCCTTCTTCTCTCT</u> <i>SmaI</i> 2B
2B-2	<u>GCGGTACCCCATGGTCTAGATTATTGTTTCTCTGCTCT</u> <i>KpnI</i> 2B
2C-1	<u>TCTAGAAAGCTTATGCTCAAAGACCGTGAC</u> <i>HindIII</i> 2C
2C-2	<u>TCTAGAGGTACCTTATTGCTTAAAAATTGG</u> <i>KpnI</i> 2C
3A-1	<u>GCGAAGCTTCTAGAAATGATCTCAATACCTTCC</u> <i>HindIII</i> 3A
3A-2	<u>TATAGTTCTGGTACCTTATTTCAGCTTGCGGTTG</u> <i>KpnI</i> 3A
3AB-2	<u>AGGTACCCCATGGTCTAGATTACTCTTGTGCGGGGAG</u> <i>KpnI</i> 3B
3ABB-2	<u>TAGGTACCTTATTCTCTTGACGACCGGGGC</u> <i>KpnI</i> 3B
3ABBB-2	<u>TCTAGAGGTACCTTACTCAGTGACAATCAA</u> <i>KpnI</i> 3B
3D-1	<u>CGCCCGGGATGGGTTGATCGTTGAT</u> <i>SmaI</i> 3D
3D-2	<u>CAGGTACCTTATTGCGTCGCCGCACAGC</u> <i>KpnI</i> 3D

^a Forward and reverse primers are indicated by -1 and -2, respectively.

^b Restriction sites introduced for cloning into pRSV vector are indicated and their nucleotides underlined. AUG initiator is shown in italics. UAA stop codon is shown in bold. The specific nucleotides for each NSPs are underlined.

coverslips in 24-well tissue culture dishes were transfected with 0.25 µg of each of the different pRSV derivatives, using Lipofectamine Plus reagent (Gibco-BRL).

Antibodies and stains

Rabbit polyclonal sera against the following FMDV proteins were used: 2B (DM21) kindly provided by D. Mackay (Institute of Animal Health of Pirbright, UK), 2C (E39), 3A (E12) and 3D^{pol} (E56) (Strebel et al., 1986). In addition, MAbs to 2C (1C8), 3A (2C2), 3B (1F8) and 3C (2D2), kindly provided by E. Brocchi (Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Brescia, Italy) and to VP1 (SD6) (Mateu et al., 1987), were employed. The following antibodies to cell proteins were employed: MAb anti-Golgi stacks protein p58 (Sigma), MAb 1D3 against PDI (protein disulfide isomerase) and rabbit serum anti-calnexin (ER markers, obtained from Stressgene), MAb CC92 to the *cis*-Golgi network protein gp74 (Alcalde et al., 1994), as well as rabbit sera to human calreticulin (Abcam) and βII-tubulin (Armas-Portela et al., 1999). Horseradish-peroxidase (HRP)-coupled anti-mouse or anti-rabbit antibodies were from Amersham. Goat antibodies anti-mouse and anti-rabbit IgGs coupled to Alexa 594 or 488 were from Molecular Probes. TO-PRO-3 double-stranded nucleic acid stain (Molecular Probes) was used for nuclear staining.

Western blot analysis

BHK-21 cell monolayers either FMDV-infected or transfected with different plasmids as described above were collected from cultured dishes (35 mm Ø) in lysis buffer (10 mM EGTA, 2.5 mM MgCl₂, 1% NP-40 and 20 mM HEPES, pH 7.4) supplemented with a 1 mM PMSF and protease inhibitor cocktail (Roche). After 10 min sonication, samples were boiled for 4 min in Laemmli buffer and resolved on a 12% SDS-PAGE. Proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane and incubated with specific FMDV antibodies, then with HRP-coupled anti-mouse or anti-rabbit antibodies and subsequently developed using an ECL kit (Amersham).

Cellular fractionation

Monolayers of BHK-21 cells (grown in 60 mm Ø dishes), either FMDV-infected or transfected with plasmids, were washed with PBS, detached from plates by scrapping, collected by centrifugation at 110 × *g* for 5 min and resuspended in 0.25 M sucrose in buffer A (50 mM Tris, 5 mM EDTA, 1 mM MgCl₂, 0.5% Triton X-100), supplemented with 1 mM PMSF and protease inhibitor cocktail. Suspensions were homogenized in ice by needle (20-gauge) passage and sonication (total homogenate). Nuclei were separated from cytoplasmic and membrane components (cytoplasmic fraction) by centrifugation at 440 × *g* for 20 min at 4 °C. The resulting pellet (nuclear fraction) was washed three times with sucrose buffered and resuspended in buffer A. Protein concentration was determined by Bradford, and equal amounts from each fraction, in Laemmli

buffer, were analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, as described above.

Immunofluorescence assays

Cells cultured on coverslips were infected or transfected as detailed above. At different times p.i., or 24 h post-transfection (p.t.), cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min, blocked and permeabilized by incubating in PBTG buffer (0.1% Triton X-100; 1% bovine serum albumin; 1 M glycine in phosphate-buffered saline, PBS) for 15 min at room temperature. Subsequently, cells were incubated with primary antibodies for 1 h, washed in PBS, incubated with fluorescent-labeled secondary antibodies for 30 min and mounted in Fluoromount-G (Southern Biotech. Assoc., USA). Nuclear staining with TO-PRO-3 was performed as recommended by the manufacturers.

Microscopy and confocal analyses

Cell preparations were viewed with an Olympus BX61 or a Confocal Radiance-2000 (BioRad/Zeiss) microscope. Images were processed with Adobe Photoshop software. Co-localization analyses after confocal images were realized using the Metamorph offline software.

Acknowledgments

We wish to thank E. Beck, E. Brocchi and D. McKay for providing us with antibodies to FMDV NSPs. We also thank C. Aparicio for her contribution to pRSV-3ABB construction, I. Sandoval, I. Correas and L. Kremer for providing us with antibodies to cell proteins and M. Saiz for her critical review of the manuscript. This work was supported by grants from CICYT, Spain (BIO2005-07592-C02-01), EU (QLK2-2001-1304) and by Fundación Severo Ochoa.

References

- Alcalde, J., Egea, G., Sandoval, I.V., 1994. gp74 a membrane glycoprotein of the *cis*-Golgi network that cycles through the endoplasmic reticulum and intermediate compartment. *J. Cell Biol.* 124 (5), 649–665.
- Aldabe, R., Carrasco, L., 1995. Induction of membrane proliferation by poliovirus proteins 2C and 2BC. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 206 (1), 64–76.
- Aminev, A.G., Amineva, S.P., Palmenberg, A.C., 2003. Encephalomyocarditis virus (EMCV) proteins 2A and 3BCD localize to nuclei and inhibit cellular mRNA transcription but not rRNA transcription. *Virus Res.* 95 (1–2), 59–73.
- Amineva, S.P., Aminev, A.G., Palmenberg, A.C., Gem, J.E., 2004. Rhinovirus 3C protease precursors 3CD and 3CD' localize to the nuclei of infected cells. *J. Gen. Virol.* 85 (Pt. 10), 2969–2979.
- Andino, R., Boddeker, N., Silvera, D., Gamarnik, A.V., 1999. Intracellular determinants of picornavirus replication. *Trends Microbiol.* 7 (2), 76–82.
- Arlinghaus, R.B., Polatnick, J., 1969. The isolation of two enzyme-ribonucleic acid complexes involved in the synthesis of foot-and-mouth disease virus ribonucleic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 62 (3), 821–828.
- Armas-Portela, R., Parrales, M.A., Albar, J.P., Martinez, A.C., Avila, J., 1999. Distribution and characteristics of betaII tubulin-enriched microtubules in interphase cells. *Exp. Cell Res.* 248 (2), 372–380.

- Bachrach, H.L., 1977. Foot-and-mouth disease virus, properties, molecular biology and immunogenicity. In: Romberger, J.A. (Ed.), *Beltsville Symposia in Agricultural Research. Virology in Agriculture*, vol. 1. Allanheld, Osmun & Co., Montclair, NJ.
- Barteling, S.J., 2004. Modern inactivated Foot-and-mouth disease (FMD) vaccines: historical background and key elements in production and use. In: Domingo, F.S.a.E. (Ed.), *Foot-and-Mouth Disease: Current Perspectives*. Horizon Bioscience, Norfolk.
- Beard, C.W., Mason, P.W., 2000. Genetic determinants of altered virulence of Taiwanese foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* 74 (2), 987–991.
- Beck, E., Forss, S., Strebel, K., Cattaneo, R., Feil, G., 1983. Structure of the FMDV translation initiation site and of the structural proteins. *Nucleic Acids Res.* 11 (22), 7873–7885.
- Belsham, G.J., 2005. Translation and replication of FMDV RNA. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 288, 43–70.
- Belsham, G.J.a.M.-S., E., 2004. Genome organization, translation and replication of foot-and-mouth disease virus. In: Domingo, F.S.A.E. (Ed.), *Foot-and-mouth Disease. Current Perspectives*. Horizon Bioscience, Norfolk, UK, pp. 19–52.
- Bienz, K., Egger, D., Pasamontes, L., 1987. Association of polioviral proteins of the P2 genomic region with the viral replication complex and virus-induced membrane synthesis as visualized by electron microscopic immunocytochemistry and autoradiography. *Virology* 160 (1), 220–226.
- Bienz, K., Egger, D., Pfister, T., Troxler, M., 1992. Structural and functional characterization of the poliovirus replication complex. *J. Virol.* 66 (5), 2740–2747.
- Bolten, R., Egger, D., Gosert, R., Schaub, G., Landmann, L., Bienz, K., 1998. Intracellular localization of poliovirus plus- and minus-strand RNA visualized by strand-specific fluorescent in situ hybridization. *J. Virol.* 72 (11), 8578–8585.
- Brown, F., 1998. Problems with BHK 21 cells. *Dev. Biol. Stand.* 93, 85–88.
- Burrows, R., Mann, J.A., Garland, A.J., Greig, A., Goodridge, D., 1981. The pathogenesis of natural and simulated natural foot-and-mouth disease infection in cattle. *J. Comp. Pathol.* 91 (4), 599–609.
- Capozzo, A.V., Burke, D.J., Fox, J.W., Bergmann, I.E., La Torre, J.L., Grigera, P.R., 2002. Expression of foot and mouth disease virus non-structural polypeptide 3ABC induces histone H3 cleavage in BHK21 cells. *Virus Res.* 90 (1–2), 91–99.
- Carrillo, C., Tulman, E.R., Delhon, G., Lu, Z., Carreno, A., Vagnozzi, A., Kutish, G.F., Rock, D.L., 2005. Comparative genomics of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* 79 (10), 6487–6504.
- Cho, M.W., Teterina, N., Egger, D., Bienz, K., Ehrenfeld, E., 1994. Membrane rearrangement and vesicle induction by recombinant poliovirus 2C and 2BC in human cells. *Virology* 202 (1), 129–145.
- Choe, S.S., Dodd, D.A., Kirkegaard, K., 2005. Inhibition of cellular protein secretion by picornaviral 3A proteins. *Virology* 337 (1), 18–29.
- de Wet, J.R., Wood, K.V., DeLuca, M., Helinski, D.R., Subramani, S., 1987. Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 7 (2), 725–737.
- Deitz, S.B., Dodd, D.A., Cooper, S., Parham, P., Kirkegaard, K., 2000. MHC I-dependent antigen presentation is inhibited by poliovirus protein 3A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97 (25), 13790–13795.
- Doedens, J.R., Kirkegaard, K., 1995. Inhibition of cellular protein secretion by poliovirus proteins 2B and 3A. *EMBO J.* 14 (5), 894–907.
- Doedens, J.R., Giddings Jr., T.H., Kirkegaard, K., 1997. Inhibition of endoplasmic reticulum-to-Golgi traffic by poliovirus protein 3A: genetic and ultrastructural analysis. *J. Virol.* 71 (12), 9054–9064.
- Domingo, E., Mateu, M.G., Martínez, M.A., Dopazo, J., Moya, A., Sobrino, F., 1990. Genetic variability and antigenic diversity of foot-and-mouth disease virus. In: Kurstak, R.G.M.E., Murphy, S.A., Van-Regenmortel, M.H.V. (Eds.), *Applied Virology Research. Virus Variation and Epidemiology*, vol. 2. Academic Press Inc., London.
- Egger, D., Teterina, N., Ehrenfeld, E., Bienz, K., 2000. Formation of the poliovirus replication complex requires coupled viral translation, vesicle production, and viral RNA synthesis. *J. Virol.* 74 (14), 6570–6580.
- Falk, M.M., Grigera, P.R., Bergmann, I.E., Zibert, A., Multhaupt, G., Beck, E., 1990. Foot-and-mouth disease virus protease 3C induces specific proteolytic cleavage of host cell histone H3. *J. Virol.* 64 (2), 748–756.
- Falk, M.M., Sobrino, F., Beck, E., 1992. VPg gene amplification correlates with infective particle formation in foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* 66 (4), 2251–2260.
- Follett, E.A., Pringle, C.R., Pennington, T.H., 1975. Virus development in enucleate cells: echovirus, poliovirus, pseudorabies virus, reovirus, respiratory syncytial virus and Semliki Forest virus. *J. Gen. Virol.* 26 (2), 183–196.
- Forss, S., Strebel, K., Beck, E., Schaller, H., 1984. Nucleotide sequence and genome organization of foot-and-mouth disease virus. *Nucleic Acids Res.* 12 (16), 6587–6601.
- Gazina, E.V., Mackenzie, J.M., Gorrell, R.J., Anderson, D.A., 2002. Differential requirements for COPI coats in formation of replication complexes among three genera of Picornaviridae. *J. Virol.* 76 (21), 11113–11122.
- Gosert, R., Egger, D., Bienz, K., 2000. A cytopathic and a cell culture adapted hepatitis A virus strain differ in cell killing but not in intracellular membrane rearrangements. *Virology* 266 (1), 157–169.
- Hope, D.A., Diamond, S.E., Kirkegaard, K., 1997. Genetic dissection of interaction between poliovirus 3D polymerase and viral protein 3AB. *J. Virol.* 71 (12), 9490–9498.
- Jackson, C.L., Casanova, J.E., 2000. Turning on ARF: the Sec7 family of guanine-nucleotide-exchange factors. *Trends Cell Biol.* 10 (2), 60–67.
- Klausner, R.D., Donaldson, J.G., Lippincott-Schwartz, J., 1992. Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J. Cell Biol.* 116 (5), 1071–1080.
- Knox, C., Moffat, K., Ali, S., Ryan, M., Wileman, T., 2005. Foot-and-mouth disease virus replication sites form next to the nucleus and close to the Golgi apparatus, but exclude marker proteins associated with host membrane compartments. *J. Gen. Virol.* 86 (Pt. 3), 687–696.
- Lama, J., Paul, A.V., Harris, K.S., Wimmer, E., 1994. Properties of purified recombinant poliovirus protein 3aB as substrate for viral proteinases and as co-factor for RNA polymerase 3Dpol. *J. Biol. Chem.* 269 (1), 66–70.
- Martinez-Salas, E., 1999. Internal ribosome entry site biology and its use in expression vectors. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10 (5), 458–464.
- Martinez-Salas, E., Domingo, E., 1995. Effect of expression of the aphthovirus protease 3C on viral infection and gene expression. *Virology* 212 (1), 111–120.
- Mateu, M.G., Rocha, E., Vicente, O., Vayreda, F., Navalpotro, C., Andreu, D., Pedroso, E., Giralt, E., Enjuanes, L., Domingo, E., 1987. Reactivity with monoclonal antibodies of viruses from an episode of foot-and-mouth disease. *Virus Res.* 8 (3), 261–274.
- Moffat, K., Howell, G., Knox, C., Belsham, G.J., Monaghan, P., Ryan, M.D., Wileman, T., 2005. Effects of foot-and-mouth disease virus nonstructural proteins on the structure and function of the early secretory pathway: 2BC but not 3A blocks endoplasmic reticulum-to-Golgi transport. *J. Virol.* 79 (7), 4382–4395.
- Monaghan, P., Cook, H., Jackson, T., Ryan, M., Wileman, T., 2004. The ultrastructure of the developing replication site in foot-and-mouth disease virus-infected BHK-38 cells. *J. Gen. Virol.* 85 (Pt. 4), 933–946.
- Nayak, A., Goodfellow, I.G., Belsham, G.J., 2005. Factors required for the uridylylation of the foot-and-mouth disease virus 3B1, 3B2, and 3B3 peptides by the RNA-dependent RNA polymerase (3Dpol) in vitro. *J. Virol.* 79 (12), 7698–7706.
- Newman, J.F., Cartwright, B., Doel, T.R., Brown, F., 1979. Purification and identification of the RNA-dependent RNA polymerase of foot-and-mouth disease virus. *J. Gen. Virol.* 45 (2), 497–507.
- Nunez, J.I., Baranowski, E., Molina, N., Ruiz-Jarabo, C.M., Sanchez, C., Domingo, E., Sobrino, F., 2001. A single amino acid substitution in nonstructural protein 3A can mediate adaptation of foot-and-mouth disease virus to the guinea pig. *J. Virol.* 75 (8), 3977–3983.
- O'Donnell, V.K., Pacheco, J.M., Henry, T.M., Mason, P.W., 2001. Subcellular distribution of the foot-and-mouth disease virus 3A protein in cells infected with viruses encoding wild-type and bovine-attenuated forms of 3A. *Virology* 287 (1), 151–162.
- Pacheco, J.M., Henry, T.M., O'Donnell, V.K., Gregory, J.B., Mason, P.W., 2003. Role of nonstructural proteins 3A and 3B in host range and pathogenicity of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* 77 (24), 13017–13027.

- Pereira, H.G., 1981. Foot-and-mouth disease. In: Gibbs, E.P.J. (Ed.), *Virus Disease of Food Animals*, vol. 2. Academic Press Inc, London.
- Porter, A.G., 1993. Picornavirus nonstructural proteins: emerging roles in virus replication and inhibition of host cell functions. *J. Virol.* 67 (12), 6917–6921.
- Ryan, M.D., Donnelly, M.L.L., Flint, M., Cowton, V.M., Luke, G., Hughes, L.E., Knox, C., de Felipe, P., 2004. Foot-and-mouth disease proteinases. In: Domingo, F.S.a.E. (Ed.), *Foot-and-Mouth Disease. Current Perspectives*. Horizon Bioscience, Norfolk, UK, pp. 53–76.
- Sandoval, I.V., Carrasco, L., 1997. Poliovirus infection and expression of the poliovirus protein 2B provoke the disassembly of the Golgi complex, the organelle target for the antipoliovirus drug Ro-090179. *J. Virol.* 71 (6), 4679–4693.
- Sanz-Parra, A., Sobrino, F., Ley, V., 1998. Infection with foot-and-mouth disease virus results in a rapid reduction of MHC class I surface expression. *J. Gen. Virol.* 79 (Pt. 3), 433–436.
- Schlegel, A., Giddings Jr., T.H., Ladinsky, M.S., Kirkegaard, K., 1996. Cellular origin and ultrastructure of membranes induced during poliovirus infection. *J. Virol.* 70 (10), 6576–6588.
- Sobrino, F., Palma, E.L., Beck, E., Davila, M., de la Torre, J.C., Negro, P., Villanueva, N., Ortin, J., Domingo, E., 1986. Fixation of mutations in the viral genome during an outbreak of foot-and-mouth disease: heterogeneity and rate variations. *Gene* 50 (1–3), 149–159.
- Sobrino, F., Saiz, M., Jimenez-Clavero, M.A., Nunez, J.I., Rosas, M.F., Baranowski, E., Ley, V., 2001. Foot-and-mouth disease virus: a long known virus, but a current threat. *Vet. Res.* 32 (1), 1–30.
- Strebel, K., Beck, E., Strohmaier, K., Schaller, H., 1986. Characterization of foot-and-mouth disease virus gene products with antisera against bacterially synthesized fusion proteins. *J. Virol.* 57 (3), 983–991.
- Suhy, D.A., Giddings Jr., T.H., Kirkegaard, K., 2000. Remodeling the endoplasmic reticulum by poliovirus infection and by individual viral proteins: an autophagy-like origin for virus-induced vesicles. *J. Virol.* 74 (19), 8953–8965.
- Tesar, M., Marquardt, O., 1990. Foot-and-mouth disease virus protease 3C inhibits cellular transcription and mediates cleavage of histone H3. *Virology* 174 (2), 364–374.
- Toja, M., Escarmis, C., Domingo, E., 1999. Genomic nucleotide sequence of a foot-and-mouth disease virus clone and its persistent derivatives. Implications for the evolution of viral quasispecies during a persistent infection. *Virus Res.* 64 (2), 161–171.
- Towner, J.S., Ho, T.V., Semler, B.L., 1996. Determinants of membrane association for poliovirus protein 3AB. *J. Biol. Chem.* 271 (43), 26810–26818.
- Whitton, J.L., Cornell, C.T., Feuer, R., 2005. Host and virus determinants of picornavirus pathogenesis and tropism. *Nat. Rev., Microbiol.* 3 (10), 765–776.
- Xiang, W., Harris, K.S., Alexander, L., Wimmer, E., 1995. Interaction between the 5'-terminal cloverleaf and 3AB/3CDpro of poliovirus is essential for RNA replication. *J. Virol.* 69 (6), 3658–3667.
- Xiang, W., Cuconati, A., Hope, D., Kirkegaard, K., Wimmer, E., 1998. Complete protein linkage map of poliovirus P3 proteins: interaction of polymerase 3Dpol with VPg and with genetic variants of 3AB. *J. Virol.* 72 (8), 6732–6741.

Productive entry of type C foot-and-mouth disease virus into susceptible cultured cells requires clathrin and is dependent on the presence of plasma membrane cholesterol

Miguel A. Martín-Acebes^a, Mónica González-Magaldi^a, Kirsten Sandvig^d,
Francisco Sobrino^{a,b,*}, Rosario Armas-Portela^{a,c}

^a Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM), Cantoblanco 28049, Madrid, Spain

^b Centro de Investigación en Sanidad Animal, INIA, Valdeolmos, 28130 Madrid, Spain

^c Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

^d Center for Cancer Biomedicine, Institute for Cancer Research, The Norwegian Radium Hospital, 0310 Oslo, Norway

Received 27 April 2007; returned to author for revision 24 May 2007; accepted 14 July 2007

Available online 21 August 2007

Abstract

We have characterized the entry leading to productive infection of a type C FMDV in two cell lines widely used for virus growth, BHK-21 and IBRS-2. Inhibition of clathrin-mediated endocytosis by sucrose treatment decreased both cell entry and virus multiplication. Evidence of a direct requirement of clathrin for productive viral entry was obtained using BHK21-tTA/anti-CHC cells, which showed a significant reduction of viral entry and infection when the synthesis and functionality of clathrin heavy chain was inhibited (Tet⁻ cells). This was also observed for vesicular stomatitis virus (VSV) productive entry. The effect of NH₄Cl and concanamycin A on FMDV entry and infection was consistent with the requirement of acidic compartments for decapsidation and virus replication. As expected from its higher stability at acidic pH, this requirement was higher for VSV. Since BHK-21 and IBRS-2 cells expressed caveolin-1, we explored the effect on productive virus entry of drugs that interfere with caveolae-mediated endocytosis. Treatment with nystatin did not reduce entry and infection of FMDV or VSV, while cholesterol depletion with M β CD significantly inhibited both steps of the FMDV cycle, indicating that plasma membrane cholesterol is required for virus productive entry. © 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

The way in which different viruses can exploit endocytic pathways to enter susceptible cells is varied and provides of a useful tool to gain basic information on the molecular mechanisms involved in membrane traffic in animal cells (Dimitrov, 2004; Marsh and Helenius, 2006). Although the clathrin-dependent pathway is the entry route best characterized for virus entry, alternative, clathrin-independent pathways are also used. These alternative pathways can be classified into two major classes: lipid-raft-dependent pathways (including the caveolar pathway) used by acid-independent viruses, and non-clathrin, non-caveolae-mediated endocytosis (Marsh and Helenius, 2006; Siczekarski and Whittaker, 2005).

Most viruses do need endocytic internalization for penetration and productive infection. A dependence on low pH for penetration drives viruses to use the decreasing pH of endocytic organelles as a cue to activate the penetration reactions and allows viral escape to the cytoplasm at specific locations before the virus is delivered to the hydrolytic lysosomes. In addition, no viral components remain on the cell surface after penetration for detection by host immune defences (Smith and Helenius, 2004). However, viruses that do not require low pH for penetration can be found in different families of non-enveloped viruses, including Picornaviruses, such as some enteroviruses (Pietäinen et al., 2004). Moreover, it has been proposed that some enteroviruses, such as poliovirus (PV), may penetrate directly through the plasma membrane, though this remains contentious (Bubeck et al., 2005; Hogle, 2002).

The Picornaviridae family comprises a wide number of important human and animal pathogens. In spite of their close structural relationships, different members of this family can

* Corresponding author. CBMSO, Cantoblanco 28049, Madrid, Spain. Fax: +34 91 4978087.

E-mail address: fsobrino@cbm.uam.es (F. Sobrino).

use a variety of entry routes into host cells (DeTulleo and Kirchhausen, 1998; Joki-Korpela et al., 2001; Marjomaki et al., 2002; Snyers et al., 2003; Stuart et al., 2002). Picornaviruses are known to undergo structural alterations during receptor interactions and entry, leading to the uncoating of the virus particle and release of the viral genome into the cytoplasm. This is required for subsequent translation and replication events (Hogle, 2002). pH stability of different Picornaviruses could be very important for uncoating. The acidic pH environment of endosomes or their rupture has been proposed as the mechanisms utilized by pH-sensitive virus (Huber et al., 2001; Schober et al., 1998), while uncoating of acid pH-stable virus takes place in other organelles (Pietiniemi et al., 2004).

Foot-and-mouth disease virus (FMDV) is the prototype member of the aphthovirus genus within the family Picornaviridae (Rowlands, 2003; Sobrino and D.E., 2004). The virus causes a vesicular disease of cloven-hoofed animals that produces high losses in livestock production and trading (Sutmoller et al., 2003). FMDV exhibits a high genetic and antigenic variability, which is reflected in seven serotypes and multiple variants, that endows this virus with a high potential for adaptation (Domingo et al., 2003). FMDV particles are composed of a non-enveloped capsid containing a linear plus strand RNA genome about 8.500 nucleotides long. This RNA encodes a single polyprotein, which is expressed and cleaved in infected cells to render capsid proteins (VP1 to 4) as well as 15 different mature non-structural proteins (Belsham, 2005). FMDV can initiate infection of cultured cells via different α_v integrins (Berinstein et al., 1995; Jackson et al., 2004; Jackson et al., 2002; Jackson et al., 2000). Viruses that are infectious in vivo can enter cultured cells using $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_6$ integrins (Jackson et al., 2000; Neff et al., 1998). This latter integrin is expressed constitutively on the epithelial cells targeted by FMDV in cattle, and it has been suggested to be the major in vivo receptor for this virus (Monaghan et al., 2005). Interaction of FMDV with these integrins requires an Arg-Gly-Asp (RGD) triplet located at the G-H loop of capsid protein VP1 (Acharya et al., 1989), which is also a main antigenic site involved in the interaction with neutralizing antibodies (Hewat et al., 1997; Mateu, 1995; Verdaguer et al., 1995).

Recent reports have approached the analysis of the early internalization events mainly by using human cell lines transfected with or constitutively expressing human integrins $\alpha_v\beta_3$ or $\alpha_v\beta_6$ (Berryman et al., 2005; O'Donnell et al., 2005). In both cases, the use of specific inhibitors and co-localization assays with cellular markers indicated that FMDV types A and O utilize a clathrin-dependent mechanism to infect these cells. This was further supported by the inhibition of infected cells observed upon expression of a dominant-negative version of AP180 that is required for clathrin cage assembly (Berryman et al., 2005). The infection reduction observed upon treatment with inhibitors of the early to late endosomal traffic, indicated also that infection occurred from early endosomes (Berryman et al., 2005), which is consistent with the high instability of FMDV capsids at pH below 7 (Curry et al., 1995; van Vlijmen et al., 1998).

In this study, two cell lines (BHK-21 and IBRS-2), widely used for basic FMDV studies, as well as for vaccine production and diagnostic purposes (Barteling, 2004; Brown, 1998), have been used to characterize the requirements for internalization leading to productive infection of a type C FMDV isolate and of VSV, a rhabdovirus causing a vesicular animal disease clinically similar to FMD, whose entry through clathrin-mediated endocytosis is well characterized (Matlin et al., 1982; Sun et al., 2005). Evidences are presented on the involvement of clathrin in productive type C FMDV endocytosis by BHK-21 and IBRS-2 cells, and of the direct requirement of clathrin heavy chain (CHC) for this process in BHK21-tTA/anti-CHC cells expressing low levels of a non-functional CHC (Iversen et al., 2003). In addition, treatment of BHK-21 and IBRS-2 cells with the cholesterol-depleting drug M β CD has revealed a dependence on plasma membrane cholesterol for FMDV entry and growth.

Results

Hypertonic shock inhibits type C FMDV infection in BHK-21 and IBRS-2 cells

Treatment with sucrose has been shown to block uptake and infection by virus that use clathrin-dependent endocytosis to entry into cells (Gilbert and Benjamin, 2000; Nicola et al., 2003) and to inhibit the uptake of type O FMDV isolates in SW480- $\alpha_v\beta_6$ cells (Berryman et al., 2005). BHK-21 and IBRS-2 cells (Fig. S1) treated with 0.45 M sucrose showed a drastic inhibition of TF internalization, a ligand whose uptake takes place by clathrin-mediated endocytosis (Sandvig et al., 1987), as well a reduced entry of type C FMDV in BHK-21 cells, whose fluorescence appeared mostly distributed at the plasma membrane (Fig. 1A). This inhibition of FMDV endocytosis correlated with a decrease in the progress of virus infection in experiments performed at low MOI, to limit the possibility of unspecific viral uptakes due to the high amount of virus used in the internalization assays. Thus, a 65% of plaque reduction was observed in BHK-21 cells treated with sucrose, relative to control cells (Fig. 1B). Likewise, detection of infected cells by immunofluorescence with a MAb to capsid protein VP1 showed that sucrose treatment significantly reduced the percentage of BHK-21 and IBRS-2-infected cells by 91% and 81%, respectively (Fig. 1C). The hypertonic shock inhibited in a similar amount the total virus yield recovered from BHK-21 or IBRS-2-infected cultures (Fig. 1C). These decreases in virus-infected cells and virus production correlated with a reduction of the amount of capsid protein VP1 detected by western blot of BHK-21-infected cell extracts (Fig. 1D).

Thus, these results are consistent with the requirement of clathrin-dependent endocytosis for type C FMDV internalization leading to virus growth.

Expression of clathrin is required for FMDV infection

Sucrose treatment might inhibit endocytic pathways other than the clathrin-dependent (Roseberry and Hosey, 2001).

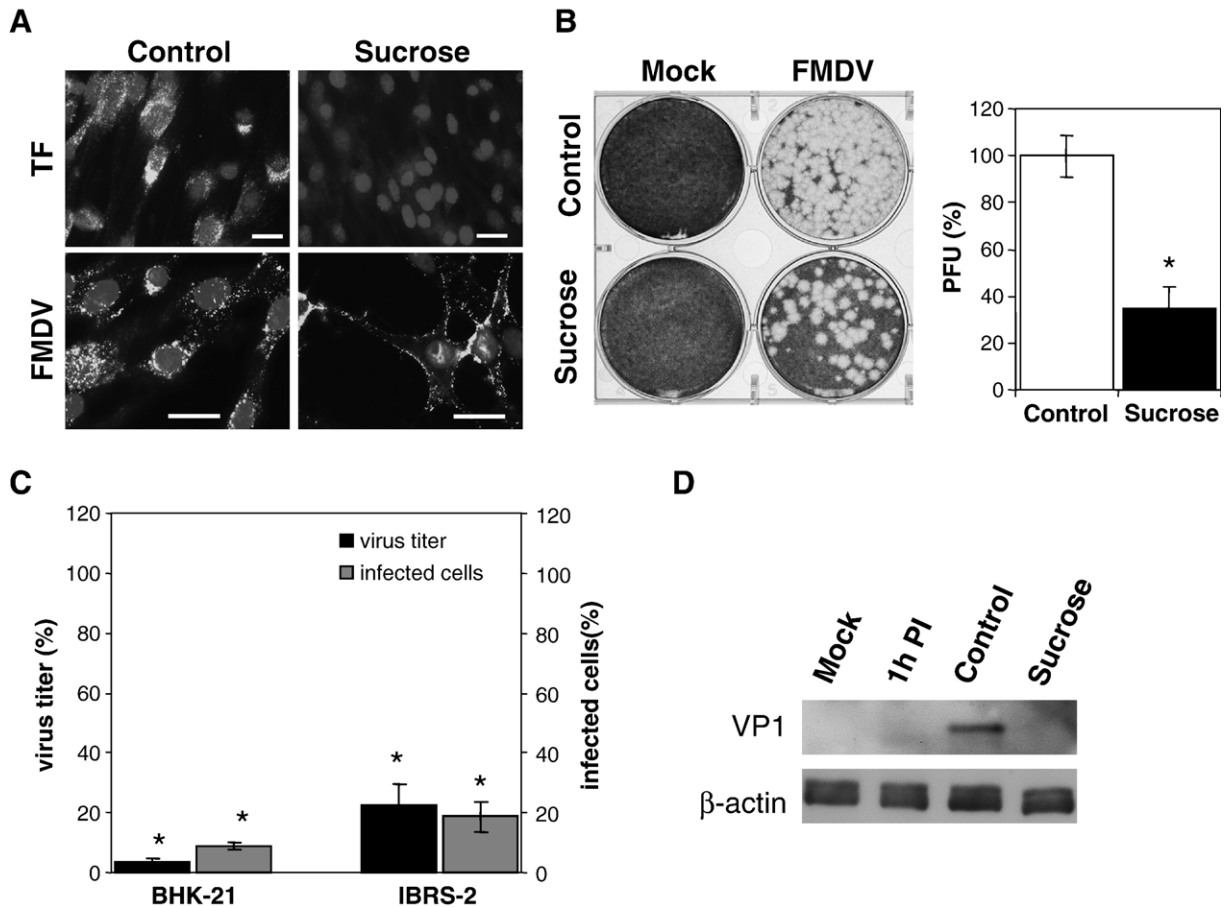


Fig. 1. Hypertonic medium inhibits FMDV internalization and infection of BHK-21 and IBRS-2 cells. (A) Sucrose treatment inhibits TF endocytosis and FMDV internalization into BHK-21 cells. Cells, incubated in hypertonic medium for 30 min, were either infected with FMDV (MOI of 35) for 25 min or incubated with Alexa Fluor 488-labeled TF. Extracellular TF was eliminated by acid wash and FMDV was detected using MAb 5C4 and a secondary antibody coupled to Alexa Fluor 488. Scale bars 20 μm. (B) FMDV plaque reduction assay in BHK-21 cells. Cells treated, or not, with sucrose were infected with FMDV (50–100 PFU) and the PFU determined as described in Materials and methods (left). The percentage of PFU recovered is relative to those of observed in untreated control cells. The means and SD from three independent experiments are shown (right). (C) Sucrose treatment inhibits FMDV infection. Sucrose treated cells were infected with FMDV (MOI of 0.5). The total virus titer at 8 h PI was determined by plaque assay on BHK-21 cells. Infected cells (6 h PI) were estimated as those positive for immunofluorescence using MAb SD6 and an Alexa Fluor 488 as secondary antibody. The percentages of virus titers and of immunofluorescent cells are relative to those observed in untreated control cells. The means and SD from three independent experiments are shown. (D) Hypertonic medium reduces FMDV VP1 expression. BHK-21 cells treated as in panel C were lysed at 6 h PI and VP1 was detected by western blot assay using MAb SD6. Blotting to an anti-β-actin MAb was included as control of protein loading.

Therefore, the direct involvement of clathrin in FMDV entry and virus multiplication was further analyzed by using a BHK-21 derived cell line (BHK21-tTA/antiCHC) stably transfected with an antisense RNA to the CHC. Transcription of this antisense RNA from a tetracycline-repressible promoter, not only inhibits expression of new CHC but induces a lack of functionality in the previously synthesized CHC molecules (Iversen et al., 2003). Type C FMDV-infected BHK21-tTA/antiCHC cells grown in the presence of tetracycline (Tet⁺). FMDV infection of these cells did not induce a clear cytopathic effect (data not shown). However, an increase of virus detection in the infection medium was found as infection progressed (Fig. 2A). The viral titres recovered, which ranged from 10^3 to 10^4 PFU/ml, were lower than those found in BHK-21-infected cells. Infection of Tet⁺ cells with VSV produced cytopathic effect and a parallel kinetic in virus production was found in the culture medium (Fig. 2A). This rhabdovirus was chosen as control in these experiments since its clathrin requirement for cell entry is well established

(Sun et al., 2005). In this case, viral titres were higher than those recovered upon FMDV infection (Fig. 2A).

Removal, of tetracycline from BHK21-tTA/antiCHC culture medium (Tet⁻) resulted in about a 70% reduction, detected by western blot of cell extracts (Fig. 2B), of a non-functional CHC (Iversen et al., 2003). As expected, a decrease in clathrin-mediated endocytosis (Fig. 2C) was observed in these cells. Thus, Tet⁻ cells positive for TF fluorescence represented only a 10% of those found in Tet⁺ cells (Fig. 2D). This lack of functional clathrin inhibited both FMDV and VSV internalization, as shown in Fig. 3A. Tet⁻ cells mostly accumulated viral fluorescence in the plasma membrane, which appeared with a perinuclear distribution in FMDV-infected Tet⁺ cells. In addition, a reduction of 67% in the PFU recovered from Tet⁻ cells infected with VSV was observed and the size of the viral plaques developed was considerably smaller (Fig. 3B). Likewise, the percentage of Tet⁻ infected cells positive to G glycoprotein fluorescence was lower (51%) than that detected in

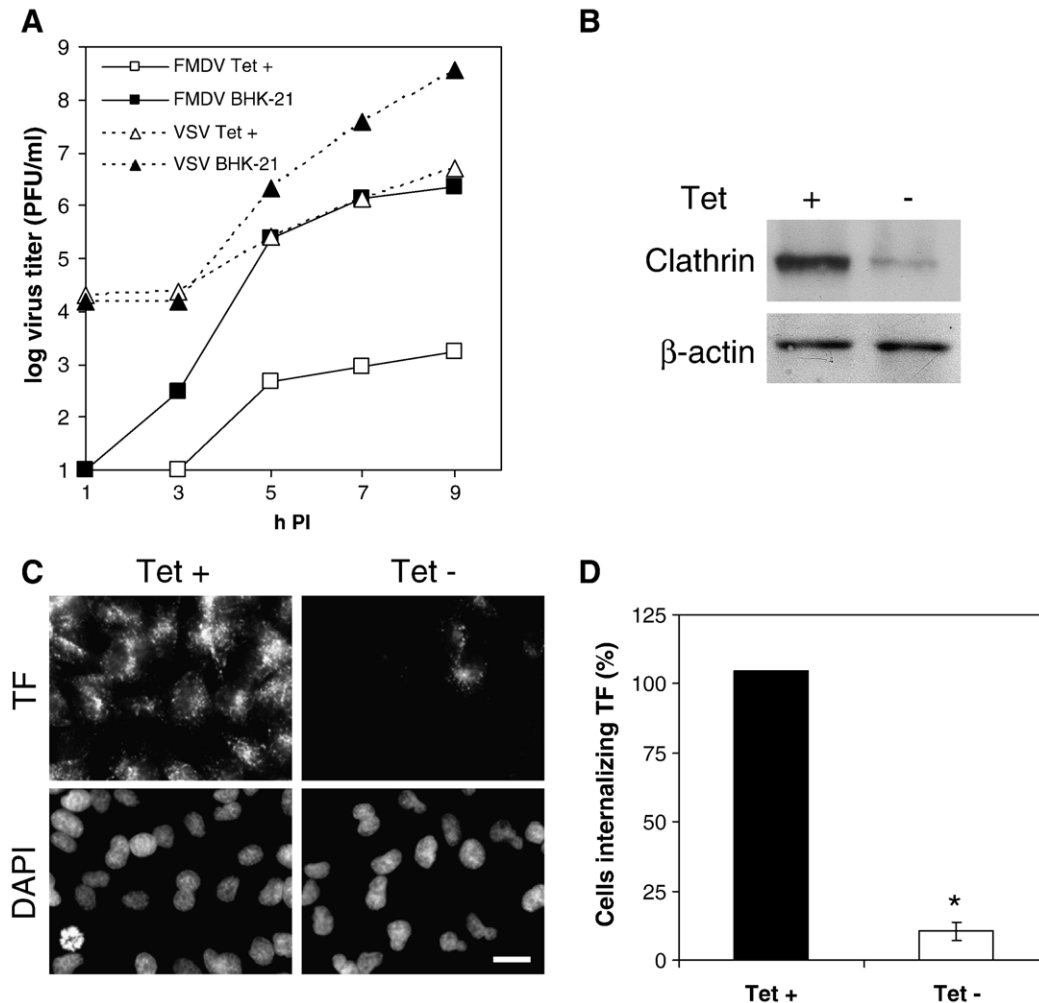


Fig. 2. Susceptibility of Tet⁺ cells to FMDV and VSV infection and effect of clathrin depletion in TF uptake. (A) Growth curve of FMDV and VSV in BHK-21 and Tet⁺ cells, which were infected at an MOI of 0.5. Virus titre in infection medium was determined, at different time points, by plaque assay on BHK-21 cells. The means of two independent experiments are shown; SD values were lower than 25%. (B) Western blot with an antiserum to CHC in Tet⁺ and Tet⁻ cells. Blotting to an anti- β -actin MAb was included as control of protein loading. (C) Expression of CHC antisense RNA inhibits TF internalization. Tet⁺ and Tet⁻ cells were incubated with Alexa Fluor 488-labeled TF, as described in Materials and methods. Scale bar: 20 μ m. (D) Expression of CHC antisense RNA reduces the number of cells internalizing TF. The percentage of cells (relative to values of Tet⁺ cells) positive for TF fluorescence, determined as in panel C, is indicated. The means and SD from three independent experiments are shown.

Tet⁺ cells (Fig. 3C). However, infection of Tet⁻ cells with FMDV did not result in detectable viral plaques and the low level of VP1 fluorescence impaired a sensitive detection of infected cells (data not shown).

To analyze virus production in Tet⁺ and Tet⁻ infected cells, total virus production was titrated in BHK-21 cells. A significant reduction in FMDV titres (about 80%) was found in Tet⁻ cells, which was similar to that observed in these cells infected with VSV (Fig. 3D).

These results confirm the direct requirement of clathrin for productive type C FMDV internalization in these BHK-21 derived cells.

Progress of FMDV infection depends on endosomal acidification

To determine the requirement of trafficking through acidic endosomes for FMDV infection progress, cells were incubated

with NH₄Cl, which blocks endosomal acidification and has been shown to inhibit FMDV and VSV growth (Baxt, 1987; Carrillo et al., 1984; Matlin et al., 1982). BHK-21 cells stained with AO showed a vesicular pattern of red fluorescence, corresponding to accumulation of AO in acidic endosomes. In contrast, and confirming the increase in endosomal pH induced by NH₄Cl, when cell cultures were incubated with 25 mM NH₄Cl, a drastic reduction of red fluorescence was observed, which was complete in cells treated with 50 mM NH₄Cl (Fig. 4A, a–c). The effect of this inhibition of endosomal acidification on FMDV infection is shown in Fig. 4A, d–f. Control cells infected with FMDV at a high MOI showed, at 3 h PI, a VP1 fluorescence pattern distributed throughout cell cytoplasm, corresponding to the novo VP1 synthesis, as expected from the progress of virus infection. In contrast, infected cells treated with NH₄Cl exhibited a VP1 fluorescence that appeared with a vesicular pattern, which resembled that observed in cells at early

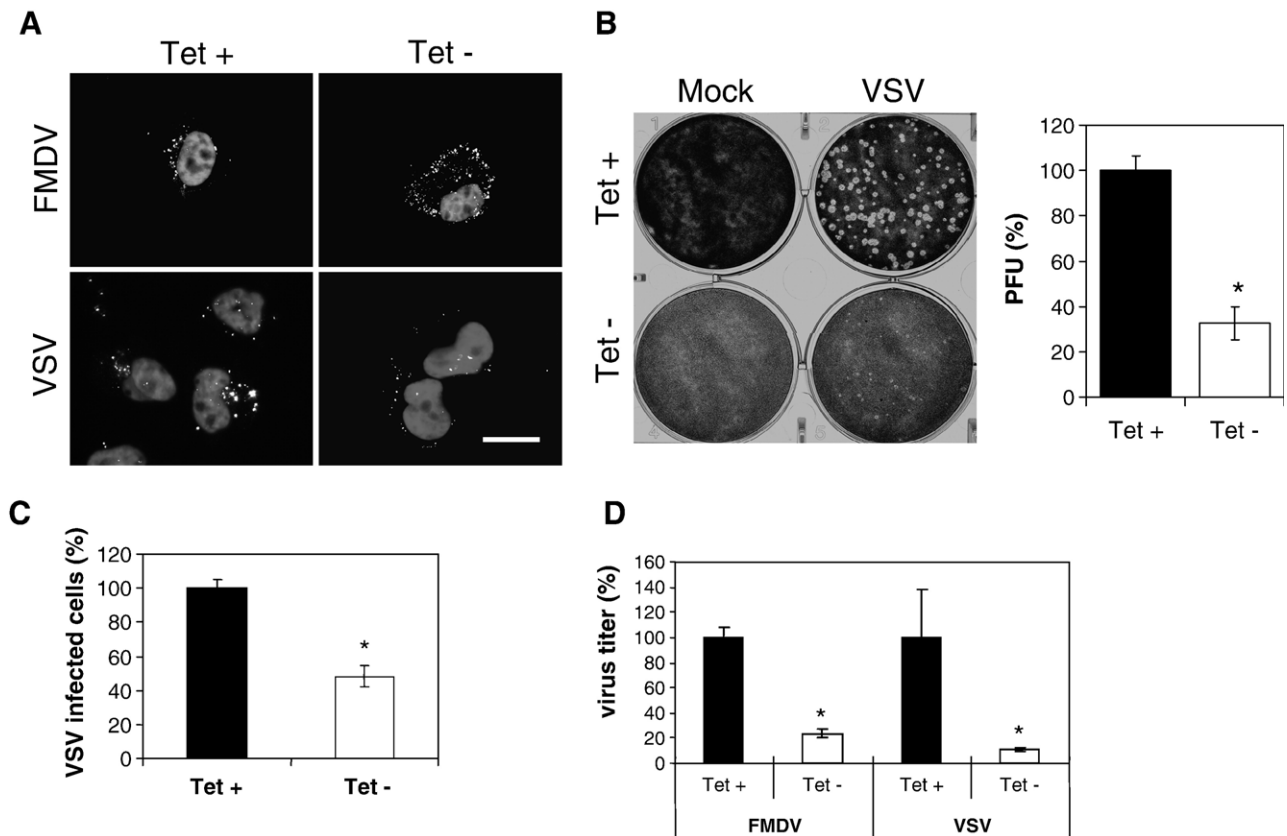


Fig. 3. Expression of CHC antisense RNA inhibits FMDV and VSV internalization and infection in Tet⁻ cells. (A) Tet⁺ and Tet⁻ cells were infected with FMDV or VSV (MOI of 35); after 25 min, cells were fixed and processed for immunofluorescence using MAb 5C4 or MAb I1, respectively. Scale bar: 20 μm. (B) PFU recovered from Tet⁺ or Tet⁻ cells infected with 50–100 PFU of VSV. The means and SD from three independent experiments are shown (right). (C) Expression of CHC antisense RNA reduces the number of VSV-infected cells. Tet⁺ or Tet⁻ cells were infected with VSV (MOI of 0.5). At 6 h PI, cells were fixed and processed for immunofluorescence using MAb I1. The means and SD from three independent experiments are shown. (D) Expression of CHC antisense RNA reduces FMDV and VSV virus yield. Tet⁺ and Tet⁻ cells were infected with FMDV or VSV (MOI of 0.5) and the virus yield at 9 h PI was determined by plaque assay in BHK-21 cells. The means and SD from three independent experiments are shown. The percentages shown in panels B–D are relative to the values of Tet⁺ cells.

times upon infection (see Fig. 1A). A parallel effect of NH₄Cl treatment was found in FMDV-infected IBRS-2 cells (see Fig. S2). As reported (Rigaut et al., 1991), treatment of BHK-21 cells with NH₄Cl blocked VSV entry progress in a comparable manner (Fig. 4A, g–i).

The blockage observed in virus progression correlated with a significant decrease in the percentage of cells expressing FMDV capsid proteins, which was reduced to values below 20% of those observed in control BHK-21 cells, being this reduction higher in IBRS-2 cells (Fig. 4B). A significant reduction in the VP1 protein detected by western blotting of BHK-21 and IBRS-2-infected cell proteins was also noticed (not shown). Likewise, the total virus yield from BHK-21 treated cells was, at least, ten-fold lower than those recovered from control cells (Fig. 4B), and again higher reductions were found in IBRS-2 cells. The susceptibility of VSV infection to NH₄Cl was higher and resulted in about a 4 log reduction of the virus yield. Treatment with NH₄Cl did not inhibit the virus yield when added to the cultures 3 h PI (data not shown), ruling out the possibility that NH₄Cl significantly affects viral replication, as reported (Baxt, 1987).

As described for type O FMDV (Berryman et al., 2005), raise of endosomal pH by pre-treatment with concanamycin A,

a specific inhibitor of V-ATPase, inhibited FMDV and, to a larger extent, VSV infection (see Fig. S3). These inhibitions were lower than those exerted by NH₄Cl, which could be due to pH recovery after concanamycin A removal (see Materials and methods). As observed with NH₄Cl, concanamycin A also induced a higher reduction in virus titers in FMDV-infected IBRS-2 cells for which inhibitions of about 90% were observed with 100 nM concentrations of the drug.

Thus, these results support that traffic through acidic compartments is required for type C FMDV decapsidation and virus replication. As expected from its higher stability to acidic pH, this requirement was higher for VSV replication.

Requirement of acidic endosomes for FMDV infection in Tet⁻ cells expressing non-functional clathrin

Treatment of Tet⁺ cells with NH₄Cl resulted in 70% reduction of the virus recovered upon FMDV infection relative to control Tet⁺ cells (Fig. 5A). Conversely, no differences in the virus yield was found between Tet⁻ cells, either treated or not with NH₄Cl, whose viral titers were similar to those found in Tet⁺ cells treated with this compound. A much higher sensitivity of VSV infection to NH₄Cl was observed. Thus, a four-log

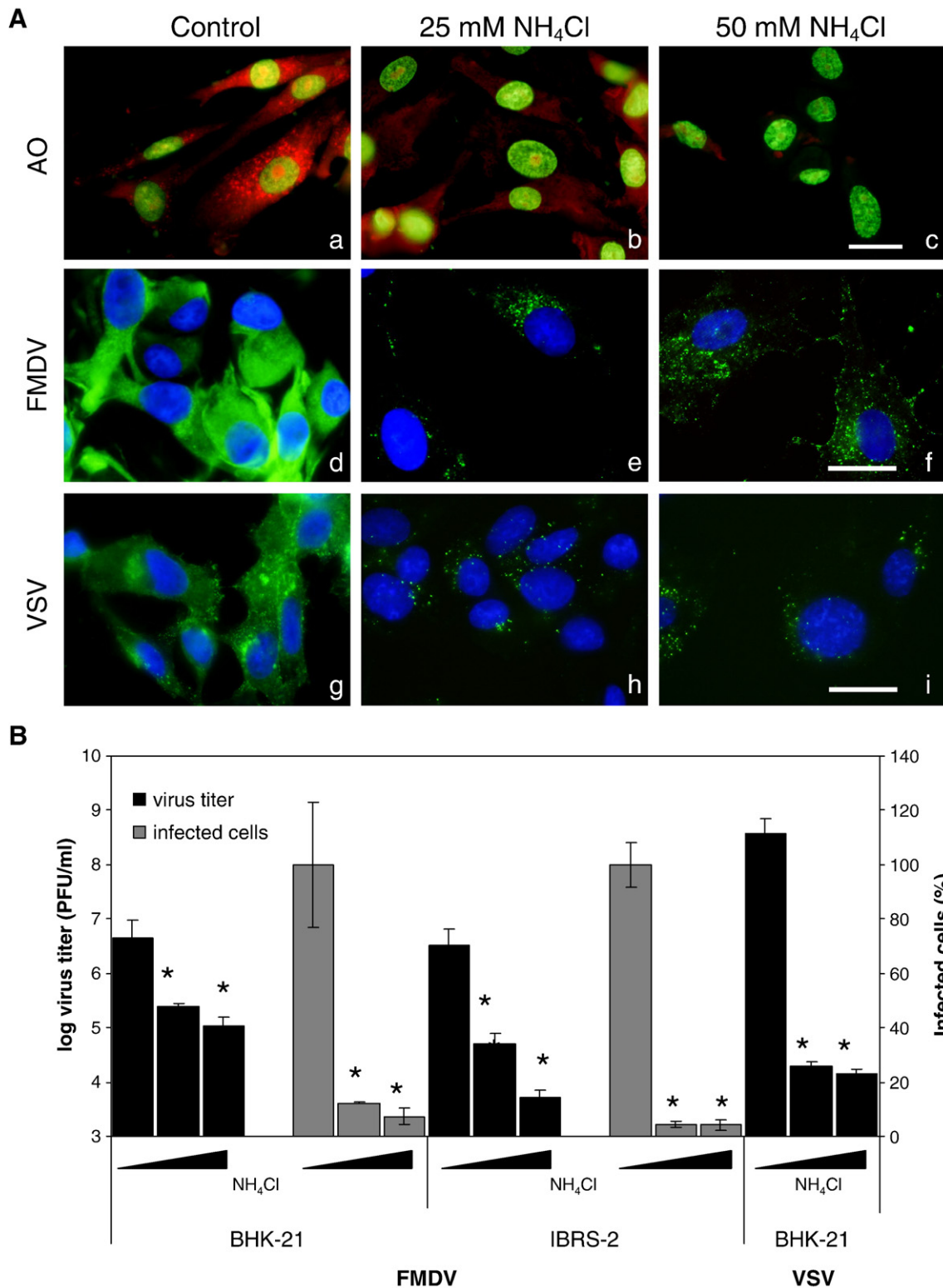


Fig. 4. Acidic pH requirement of FMDV and VSV infection. (A) Effect of different concentrations of NH₄Cl in FMDV and VSV infection of BHK-21 cells. (a) AO staining of control cells in which acidic organelles are stained in red and nuclei in green. (b) AO staining of cells treated 25 or (c) 50 mM NH₄Cl. (d–f) NH₄Cl treatment blocks FMDV infection. After 3 h of FMDV infection (MOI of 35), cells were fixed and processed for immunofluorescence using MAb 5C4. Untreated control cells (d) and cells treated with 25 or 50 mM NH₄Cl (e and f, respectively). (g–i) NH₄Cl treatment blocks VSV infection. Cells infected with VSV, as for FMDV, were fixed and processed for immunofluorescence using MAb II. Scale bars: 20 μm. (B) NH₄Cl inhibits FMDV and VSV infection. Cells non-treated and treated with 25 or 50 mM NH₄Cl were infected with FMDV or VSV (MOI of 0.5). Total virus yield at 8 h PI was determined by plaque assay on BHK-21 cells. The number of infected cells expressing FMDV VP1 was determined, at 6 h PI, by immunofluorescence using MAb SD6, and the percentage of infected cells (relative to control untreated cells) is indicated. The means and SD from three independent experiments are shown. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

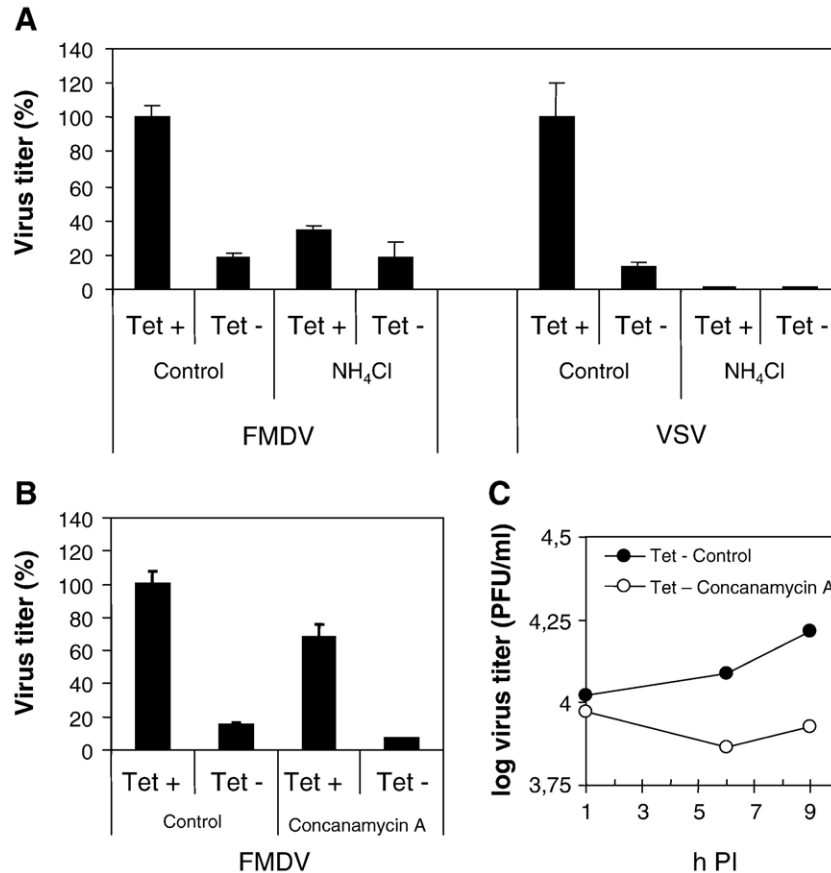


Fig. 5. Effect of endosomal acidification blockage of Tet⁺ and Tet⁻ cells on FMDV and VSV internalization and infection. (A) Effect of NH₄Cl treatment. Tet⁺ and Tet⁻ cells were treated with 25 mM NH₄Cl and then infected with FMDV or VSV (MOI of 0.5). Total virus yield, at 9 h PI, was determined by plaque assay in BHK-21 cells and is presented as a percentage, relative to values of Tet⁺ cells. The means and SD from three independent experiments are shown. (B) Effect of concanamycin A treatment. Tet⁺ and Tet⁻ cells were treated with 1000 nM concanamycin A and total virus yield in infected cells was determined as in panel A. The means and SD from three independent experiments are shown. (C) Time course of FMDV growth on Tet⁻ cells treated with 1000 nM concanamycin A. Tet⁻ cells were infected with FMDV (MOI of 0.5) and at different times PI total virus yield was determined. The means of two independent experiments are shown; SD values were lower than 15%.

reduction in the virus yield was determined for either Tet⁺ or Tet⁻ cells, infected with VSV in the presence of NH₄Cl.

These results could suggest that type C FMDV entering Tet⁻ cells, which lack functional clathrin exploit alternative endocytic pathways that either led the virus to other compartment less affected by the acidification blockage exerted by NH₄Cl, or in which a pH decrease is not required for viral RNA release. This possibility was not supported by the results obtained using concanamycin A. With this drug, a limited, but significant, reduction in virus titer was observed at 9 h PI for Tet⁺ and Tet⁻ cells (Fig. 5B). For Tet⁻ cells, a limited increase with time in virus titer was observed, while such increase was not detectable, at different hours post-infection, in Tet⁻ cells treated with concanamycin A (Fig. 5C). Thus, our results suggest that FMDV multiplication in Tet⁻ cells requires acidic endosomes.

BHK-21 and IBRS-2 cells express caveolin-1

To evaluate whether caveola-mediated endocytosis could contribute to FMDV internalization, we first analyzed the expression of caveolin-1 in BHK-21 and IBRS-2 cells. Fig. 6A shows a western blot of cell extracts of BHK-21 and IBRS-2.

The rabbit polyclonal antibody anti-caveolin 1 used showed that both cell lines expressed caveolin-1, being the level of expression detected higher in BHK-21 cells. As reported (Millan et al., 1997), no caveolin-1 expression was detected in Jurkat cells, used as control. Fig. 6B shows the immunofluorescence pattern of caveolin-1 in IBRS-2, which appeared as membrane-associated vesicles, corresponding to lipid-rafts and caveolae, as well as with a perinuclear distribution characteristic of a Golgi location, as reported (Kurzchalia et al., 1994). Similar results were obtained using BHK-21 cells (data not shown).

Role of cholesterol in FMDV endocytosis and virus production

Since BHK-21 and IBRS-2 cells express caveolin-1, we explored the effect on FMDV entry of drug treatments interfering with caveola-mediated endocytosis. Cholesterol is an important component of lipid-rafts, which are involved in caveola formation. Thus, we analyzed the effect on FMDV entry and infection progress of the cholesterol-sequestering compound nystatin that selectively disrupts membrane lipid-rafts, including those required for caveolae formation (Chen and

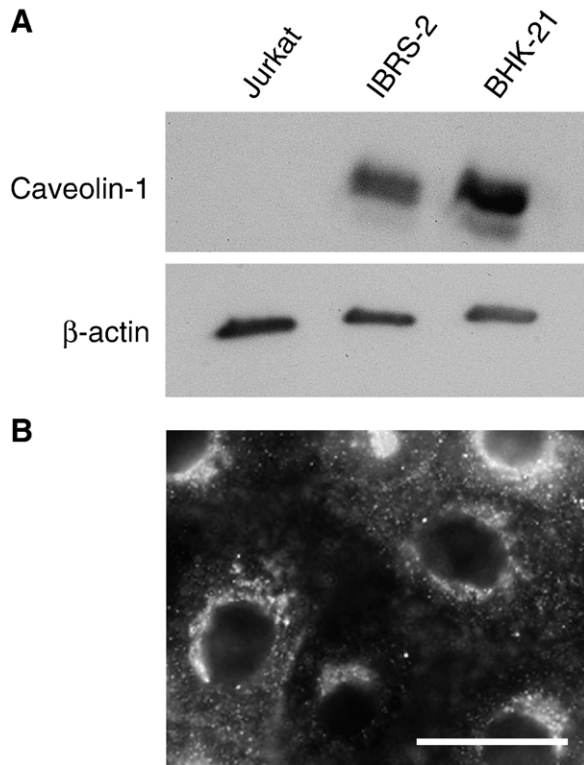


Fig. 6. Caveolin-1 expression in BHK-21 and IBRS-2 cells. (A) Western blot of BHK-21 and IBRS-2 cell extracts with anti-caveolin 1 antibody. Extracts of Jurkat cells that do not express caveolin-1 were included as control. Blotting to an anti- β -actin MAb was included as control of protein loading. (B) Immunofluorescence of IBRS-2 cells incubated with anti-caveolin 1 antibody and an Alexa Fluor 488-labeled secondary antibody. Scale bar: 20 μ m.

Norkin, 1999), and of M β CD that depletes cholesterol from cell membranes (Sieczkarski and Whittaker, 2002a; Simons and Ikonen, 1997). A pre-treatment of cells with 25 μ g/ml of nystatin for 1 h (70% and 82% cell viability for BHK-21 and IBRS-2, respectively) was chosen for these experiments. Fig. 7A shows that the internalization of labeled CTX, a lipid raft-ligand that can use different endocytic mechanisms (Torgersen et al., 2001), including a non-clathrin, non-caveolae pathway (Chinnapen et al., 2007), was, as expected, reduced in BHK-21 cells by the treatment with nystatin. Nevertheless, no effect was observed in the internalization of either FMDV or labeled TF (Fig. 7A).

Treatment of BHK-21 cells with 10 mM M β CD resulted in a severe depletion of the cholesterol at the cell membrane, as estimated by cell staining with the cholesterol-binding drug filipin. As reported (Keller and Simons, 1998), this treatment did not significantly alter the cholesterol found in intracellular membranes. A clear inhibition of CTX uptake was found in cells treated with M β CD. A similar effect was noticed in the

internalization of FMDV, whose virions were preferentially detected at the surface of infected cells treated with M β CD (Fig. 7A). Similar results were observed in IBRS-2 cells treated with M β CD (Fig. S4). Uptake of TF was also affected by the M β CD treatment, confirming the requirement of cholesterol in the clathrin-mediated endocytosis, as previously reported (Rodal et al., 1999).

Then, we studied the effect of nystatin and M β CD on post-entry steps of viral cycle leading to productive infection. In fact, the results obtained with BHK-21 and IBRS-2 cells showed a good correlation with those observed on viral internalization. Thus, relative to control cells, no significant reductions in the percentage of infected cells expressing capsid protein VP1, or in the virus yield recovered from infected cultures treated with nystatin, were noticed (Fig. 7B). This lack of effect on the virus yield was also observed for VSV-infected cells. Conversely, depletion of cholesterol with M β CD in the two cell lines studied, resulted in a significant reduction of the FMDV-infected cells, which showed values of 63% and 40% for BHK-21 and IBRS-2, respectively. Similar reductions were observed in the virus production, which paralleled that found in VSV-infected cells (Fig. 7B).

Thus, while the reorganization of cholesterol induced by nystatin does not affect type C FMDV entry and progression, depletion of cholesterol from plasma membranes by M β CD decreases FMDV internalization and virus infection.

Discussion

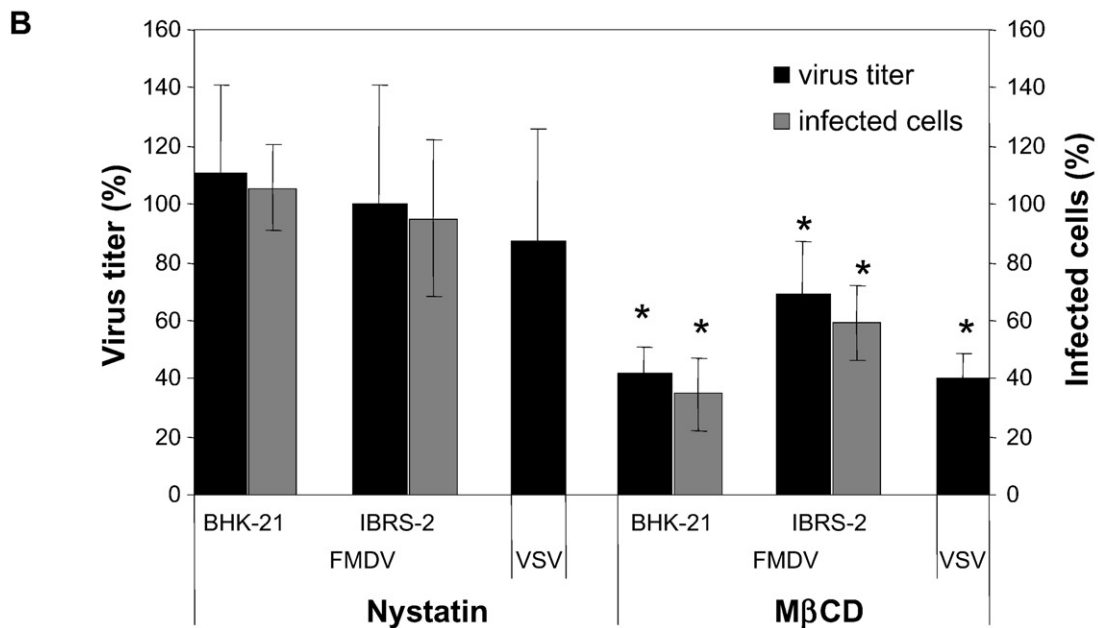
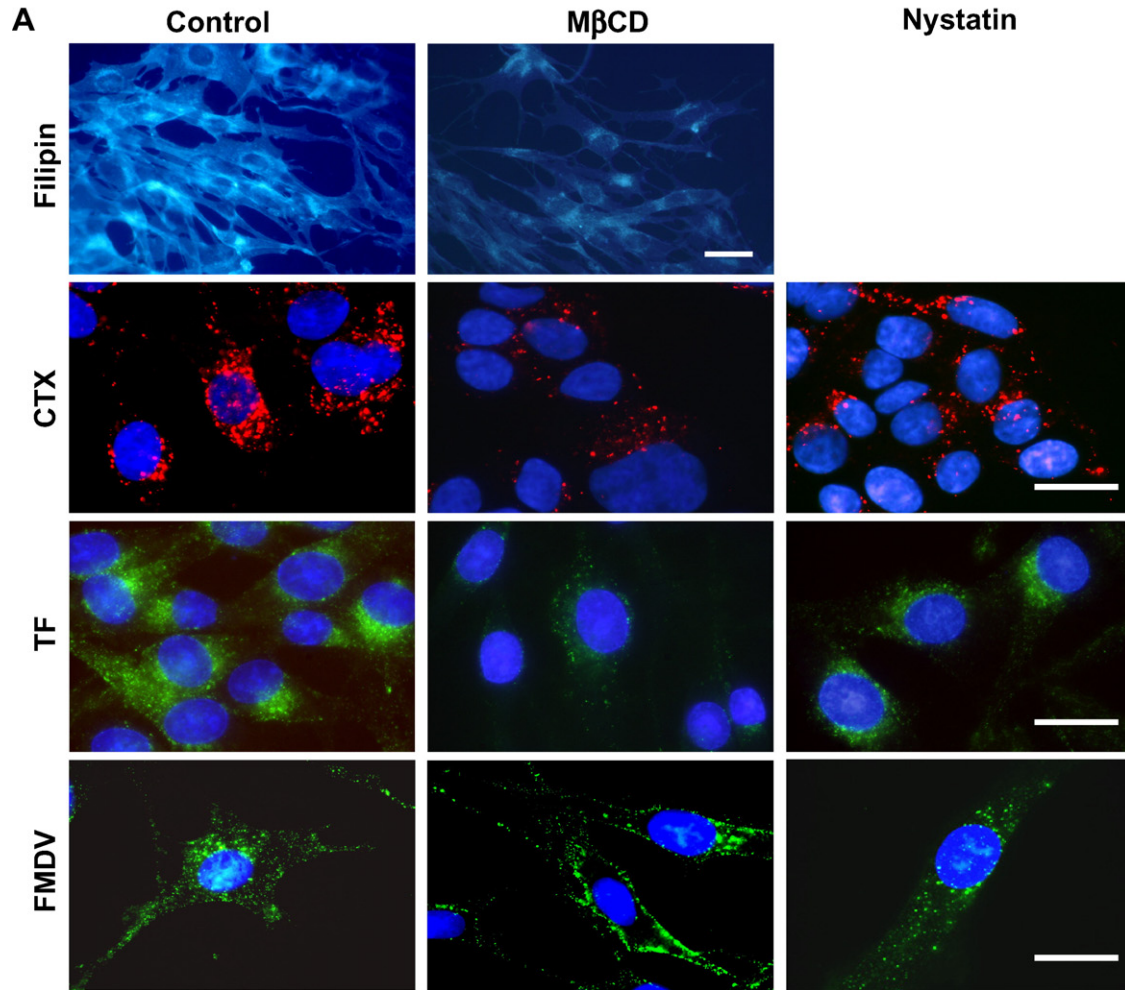
Viruses that enter host cells by endocytosis are becoming interesting tools in studies of membrane traffic in animal cells. Recently, they have been used to characterize novel endocytic mechanisms that bypass the classical clathrin-mediated uptake processes (Damm et al., 2005; Pietiainen et al., 2004). The type C FMDV used in our study mainly enters established cell lines derived from porcine (IBRS-2) and hamster (BHK-21) cells by using a clathrin-dependent endocytosis, as indicated by uptake blockage of FMDV particles observed in immunofluorescence assays upon sucrose treatment. This blockage affects also the progression of virus infection, as indicated by the reductions in infected cells and virus yield in infections performed at low MOI to limit productive viral entries that could exploit pathways other than those more efficiently used by FMDV. These results extend previous observations on the entry requirements of FMDV isolates from different serotypes in cells expressing human $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_6$ integrins (Berryman et al., 2005; O'Donnell et al., 2005), to the productive infection by serotype C FMDV of two widely used cell lines.

IBRS-2 cells express $\alpha_v\beta_8$ integrin (Burman et al., 2006), while BHK-21 have been reported to express $\alpha_v\beta_3$ (Chu and

Fig. 7. Role of cholesterol in FMDV entry and infection. (A) Effect of M β CD and nystatin on endocytosis pathways. BHK-21 cells treated with 10 mM M β CD or with 25 μ g/ml of nystatin were incubated with Alexa Fluor 594-labeled CTX, Alexa Fluor 488 TF or infected with FMDV (MOI of 35) for 25 min, fixed and processed for immunofluorescence staining of VP1 using MAb 5C4 and an Alexa Fluor 488 secondary antibody. Control of cholesterol depletion after M β CD treatment was analyzed by filipin staining. Scale bars: 20 μ m. (B) Analysis of virus infection after M β CD or nystatin treatment. Cells, incubated with nystatin or M β CD as described in panel A, were infected with either FMDV or VSV (MOI of 0.5). At 8 h PI, total virus yield was determined by plaque assay on BHK-21 cells. The number of infected cells expressing FMDV VP1 was determined, at 6 h PI, by immunofluorescence using MAb SD6. The percentages of virus titers and of infected cells are relative to those observed in untreated control cells. The means and SD from three independent experiments are shown.

Ng, 2004). The FMDV C-S8sc1 used in this study showed sequence identity in the capsid proteins to that published for the original isolate, which infected cultured cells via integrins

receptors (Baranowski et al., 1998; Jackson et al., 2000). These, rule out the possibility of selection, during virus amplification, of the mutation reported to confer type C FMDV the capacity to



enter cultured cells via heparan sulphate (Baranowski et al., 1998). Since α_v integrins have been shown to be internalized into clathrin-coated pits and subsequently transferred to early endosomes (Berryman et al., 2005; Upla et al., 2004), the results reported here likely correspond to type C FMDV integrin-mediated entry and progression in BHK-21 and IBRS-2 cells. The lack of MABs efficiently recognizing the integrins expressed in these cell lines (O'Donnell et al., 2005) has impaired the inclusion in our study of data from integrin internalization. We cannot exclude that the inhibition of clathrin-dependent endocytosis could alter expression of virus receptors at the cell surface leading to reduced virus binding and infection and this could contribute to the inhibitory effects found. However, FMDV appears attached at the cell membrane in cells treated with sucrose in our experiments as well as in those reported by (Berryman et al., 2005), suggesting that a major alteration in the expression of integrins does not occur upon sucrose treatment. On the other hand, transferrin receptor (another ligand taken in by clathrin-dependent endocytosis), which co-localizes in the same endosomes with FMDV and its $\alpha_v\beta_6$ receptor (Berryman et al., 2005; O'Donnell et al., 2005), rather than being depleted, accumulates in the membrane surface of Tet⁻ cells (Iversen et al., 2003). These results suggest that the inhibitions observed are mostly due to inhibition of uptake of surface-bound viruses from clathrin coated pits.

Interestingly, the results obtained with BHK21-tTA/anti-CHC show a direct, functional requirement of clathrin (CHC) for FMDV entry and multiplication. The dependence on CHC for infection of viruses using clathrin-mediated endocytosis has been previously reported utilizing different strategies. (Pelkmans et al., 2005; Sun et al., 2005; Wettestad et al., 2002). However, to our knowledge, this is the first study that has utilized an inducible cell line against CHC for virus entry characterization. Other inducible cell lines, such as those expressing dominant negative forms of dynamin, have been revealed as valuable tools to uncover the entry route of different viruses (Chung et al., 2005; DeTulleo and Kirchhausen, 1998; Snyers et al., 2003). However, the negative mutant of dynamin can inhibit several types of endocytosis. It inhibits uptake from caveolae (Oh et al., 1998) as well as clathrin- and caveolae-independent endocytosis that can be dependent on dynamin (Lamaze et al., 2001).

In our experiments (Fig. 3D), a residual level of FMDV infection was observed when clathrin-mediated endocytosis was blocked by tetracycline removal in Tet⁻ cells. Despite the low virus yield recovered from infected Tet⁻ cells, no additive effect on this inhibition was observed upon NH₄Cl treatment, (Fig. 5A), while a reduction was observed in cells treated with concanamycin A (Figs. 5B, C). These observations suggest that type C FMDV entry in these cells, which lack functional clathrin, could exploit alternative endocytic pathways that led the virus to acidic compartments where viral RNA is released. Transit through early acidic endosomes for productive internalization can use endocytic pathways other than the clathrin-mediated, as reported for Influenza virus (Sieczkarski and Whittaker,

2002b) and diphtheria toxin (Skretting et al., 1999). However, we cannot exclude that the FMDV infection observed when clathrin is blocked could be due to some “leakiness” in the system rather than a true clathrin-independent entry phenomenon. In any case, further experiments are required to confirm this possibility.

The expression of caveolin-1 by BHK-21 and IBRS-2 cells has also allowed the analysis of the potential contribution of the caveolae-mediated internalization pathway in FMDV entry. As cholesterol is an important component of lipid-rafts, which are involved in caveolae formation, we analyzed the effect on FMDV entry and infection of nystatin, a sterol-binding drug that sequesters cholesterol, and of M β CD that depletes cholesterol from membranes (Sieczkarski and Whittaker, 2002a). The results obtained support that FMDV endocytosis in BHK-21 and IBRS-2 cells is not affected by the lack of lipid-rafts integrity reported to be induced by nystatin (Chen and Norkin, 1999) but depends on the presence of certain levels of cholesterol in the plasma membrane, probably as this molecule seems to be required for the formation of clathrin-coated vesicles (Rodal et al., 1999; Subtil et al., 1999), for the regulation of downstream stages (Peres et al., 2003) and for recruitment of clathrin vesicles machinery (Urs et al., 2005). Indeed, extraction of plasma membrane cholesterol with M β CD has been shown to inhibit clathrin-mediated endocytosis of human rhinovirus (Snyers et al., 2003) and a requirement of cholesterol, but not of lipids-rafts, has also been recently reported for poliovirus cell entry (Danthi and Chow, 2004). Previous studies, performed with a lower concentration of M β CD than that used in this study, showed that infection of SW480- $\alpha_v\beta_6$ cells with type O FMDV was not affected by M β CD treatment (Berryman et al., 2005). This discrepancy could be due to the different susceptibility to the drug of the cell types used, as reported in other viral models (Gilbert and Benjamin, 2000; Richterova et al., 2001).

Interestingly, the differences in the sensitivity to endosomal acidification inhibition by NH₄Cl or concanamycin A (Fig. 4 and Fig. S3) suggest that FMDV and VSV may uncoat into different classes of endosomes. Supporting this idea, VSV has been shown to deliver its genetic material to cytoplasm from late endosomes (Le Blanc et al., 2005), whereas FMDV has never been found in late endosomes or lysosomes (Berryman et al., 2005; O'Donnell et al., 2005). These differences in intracellular trafficking may reflect differential sorting from distinct populations of clathrin-coated pits involved in FMDV and VSV internalization. Such differences have been described for other ligands of the clathrin endocytic pathway that are sorted to populations of early endosomes that either mature rapidly toward late endosomes, or that mature much more slowly (Lakadamyali et al., 2006). However, these differences could not be revealed by treatments directly targeted to clathrin-coated pit endocytosis, as CHC depletion. These findings show the usefulness of performing comparative studies with different viruses in order to study in depth the multiple viral internalization pathways (Damm and Pelkmans, 2006; Pelkmans et al., 2005).

Materials and methods

Cells and viruses

BHK-21 cells (ATCC) and IBRS-2 (c-26) cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 5% fetal calf serum (FCS) (Gibco), penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml) and 20 mM L-glutamine. BHK21-tTA/anti-CHC cells (Iversen et al., 2003) were maintained in select DMEM supplemented with 10% FCS, 200 µg/ml geneticin (Gibco), 0.5 µg/ml puromycin (Sigma) and 2 µg/ml tetracycline (Sigma). For induction of CHC anti-sense RNA expression, cells were grown in select DMEM and tetracycline was removed 72 h prior to the experiments. FMDV isolate C-S8c1, a derivative of a type C field virus isolated in Santa Pau (Spain, 1970) by triple plaque purification (Sobrinho et al., 1983), and VSV (Indiana serotype) were used in this study. Viral stocks were prepared by infecting at a multiplicity of infection (MOI) – defined as the plaque forming units of virus (PFU)/cell – of about 1, monolayers of BHK-21 cells, as described below. Viral RNA from C-S8c1 stock was amplified by RTR-PCR and used to determine the nucleotide sequences corresponding to the capsid proteins, as described (Nunez et al., 2001); the sequences obtained were as previously published (Toja et al., 1999).

Antibodies and reagents

FMDV VP1 and VSV G protein were detected using monoclonal antibodies (MAb) SD6 or 5C4 (Lea et al., 1994; Mateu et al., 1987) and MAb II (Lefrancois and Lyles, 1982), respectively. Rabbit polyclonal antibodies were used to detect caveolin-1 (BD Transduction Laboratories) and clathrin heavy chain (Sta. Cruz Biotechnology). MAb anti-β-actin AC-15 was from Sigma. Sheep anti-mouse IgG and donkey anti-rabbit IgG coupled to horseradish peroxidase were from Amersham. Goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 488 or 594 labeled, as well as transferrin (TF) and cholera toxin (CTX) conjugated to Alexa Fluor 488 or 594, respectively, were from Molecular Probes. Nystatin, filipin III, methyl-β-cyclodextrin (MβCD), concanamycin A and bovine serum albumin (BSA) were purchased from Sigma. Sucrose and NH₄Cl were from Merck. Nystatin, filipin and concanamycin A were prepared in DMSO as 5 mg/ml, 2.5 mg/ml and 28.8 µM stock solutions, respectively. NH₄Cl (1 M) was dissolved in water and the rest of chemicals were directly prepared in DMEM.

Drug treatments

For endocytosis inhibition, cells grown on tissue culture plates or coverslips, were washed twice with DMEM and incubated with the corresponding drug for the appropriate time. Control cells were incubated in the same conditions in DMEM containing the solvent concentration used for each drug. To test the role of lipid-rafts and cholesterol in endocytosis, cells were pre-treated for 1 h with a nystatin concentration (25 µg/ml), which was selected after a viability assay, or by treatment with

MβCD (10 mM) for 30 min, as previously reported (Keller and Simons, 1998). Nystatin was maintained during the whole infection period while MβCD was present only during pre-treatment. The role of clathrin in endocytosis was tested by a hypertonic shock induced by treating cells for 30 min with 0.45 M sucrose in DMEM before FMDV infection or fluorescent TF incubation, the later as control of the clathrin pathway impairment. To avoid cellular recovery, sucrose was maintained during the first hour of infection or during the TF internalization time. The lysosomotropic agent NH₄Cl was used to block endosomal acidification. Cells were pre-treated for 1 h with 25 or 50 mM NH₄Cl in DMEM with 25 mM HEPES pH 7.4 and the drug was maintained during the whole infection period to avoid cellular recovery. For concanamycin A treatment, cells were pre-treated 30 min and the drug was maintained during the first hour of infection, as reported (Berryman et al., 2005).

Infections and virus titration

Cells grown on coverslips or tissue culture plates were infected at different MOI with virus diluted in DMEM. After 1 h of adsorption, the inoculum was removed and fresh medium containing 5% FCS was added. Virus yield was determined by plaque assay on BHK-21 cell monolayers, as described (Sobrinho et al., 1983). Briefly, cells were adsorbed with infection medium samples, the inoculum removed after 1 h and the infection allowed to proceed for 24 h in semisolid medium (0.5% agar, 1% FCS and 0.045 mg/ml DEAE-Dextran in DMEM) to determine virus titers (PFU/ml). Finally, the cells were fixed and stained with 0.3% crystal violet in 2% formaldehyde. To determine total virus production (intracellular and infection medium), plates were subjected to three freeze–thaw cycles and the virus titer determined as described above. When performing infections for western blot analyses or to determine FMDV virus yield after endocytosis inhibition, extracellular virions were acid inactivated after the first hour of infection by washing with PBS pH 6.0, followed by two washes with DMEM to neutralize extracellular pH. For plaque reduction assays, cell monolayers were infected with 50–100 viral PFU, and the PFU developed in semisolid medium were quantified as described above.

Transferrin and cholera toxin internalization

For TF endocytosis assays, cells grown on coverslips, were washed twice with DMEM and were incubated with 10 µg/ml TF-Alexa Fluor 488 prepared in DMEM containing 0.5% BSA. After 5 min of internalization at 37 °C, cells were washed with 200 mM acetic acid and 200 mM NaCl and sequentially with 150 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 7.4, 10 mM glucose, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂ and 1 mM CaCl₂ to eliminate extracellular TF (Lukacs et al., 1997). Finally, the cells were washed twice with PBS and fixed in 4% paraformaldehyde in PBS. In the case of CTX endocytosis assays, cells were incubated 30 min with CTX-Alexa Fluor 594 (8 µg/ml) in DMEM containing 0.5% BSA, washed twice with PBS and fixed. Aldehyde fluorescence

was quenched by incubating cells 15 min with 1 M glycine in PBS.

Immunofluorescence

Cells grown on coverslips were washed twice with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 20 min, washed with PBS and permeabilized with BPTG (1% BSA, 0.1% Triton-X 100, 1 M glycine in PBS) for 15 min at room temperature (RT). Primary antibodies prepared in 1% BSA in PBS were incubated for 1 h at RT. Cells were washed with PBS, stained with the corresponding fluorescent antibody for 30 min at RT and then washed with PBS. Cell nuclei were counterstained with 1 µg/ml DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) in PBS for 5 min, rinsed with PBS and mounted in Fluoromount G (Southern Biotech Assoc., USA). Samples were observed using an Olympus BX61 epi-fluorescence microscope coupled to a digital camera DP70 (Olympus). Images were acquired using Olympus DP controller software and processed using Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems Inc.).

Detection of infected cells

Monolayers of BHK-21 or IBRS-2 cells grown on glass coverslips were infected, fixed at 6 h post-infection (PI) and processed for immunofluorescence using MAbs SD6 and I1 to detect FMDV or VSV, respectively. For quantification of infected cells, a minimum of 300 cells per coverslip were scored (three coverslips).

Acridine orange vital staining

Fluorescent labeling of acidic organelles was performed using acridine orange (AO) vital staining, as reported (Al-Younes et al., 1999). AO fluorescence is red when it protonates and accumulates in acidic vesicles. Briefly, cells treated with NH₄Cl as described above were incubated in fresh medium, containing or not NH₄Cl and 5 µg/ml AO for 10 min at 37 °C, washed three times with the same media without AO and observed under fluorescence microscope using a filter set that permits simultaneous observation of green and red fluorescence.

Filipin staining

Cholesterol levels in cells treated with MβCD were estimated by filipin staining, as previously described (Keller and Simons, 1998). Briefly, cells were fixed on ice in 4% paraformaldehyde, stained 15 min at RT with 125 µg/ml filipin in PBS, washed twice with PBS for 15 min and mounted in Fluoromount G.

Western blot

Cells were lysed on ice in lysis buffer (10 mM EGTA, 2.5 mM MgCl₂, 1% NP-40, 20 mM HEPES pH 7.4), collected with a cell scraper and sonicated. Equal amounts of protein,

estimated by Bradford, were mixed with Laemmli sample buffer. After SDS–PAGE electrophoresis proteins were transferred onto nitrocellulose membranes and incubated with specific antibodies, then with HRP-coupled anti-mouse or anti-rabbit antibodies and subsequently developed using western lighting chemiluminescence reagent (Perkin Elmer), as described (García-Briones et al., 2006). Relative CHC levels were determined by image analysis using a Typhoon 9410 scanner and ImageQuant TL software (Amersham).

Data analysis

Analysis of the variance (ANOVA) using *F* Fischer–Snedecor distribution was performed with statistical package SPSS v.12 (SPSS Inc.) for Windows. Differences were considered statistically significant at *p* < 0.05 and are indicated by an asterisk in the figures.

Acknowledgments

We wish to thank M. Dávila and E. Domingo for providing us with VSV Indiana isolate and with MAb I1, and M. López for her technical assistance. This work was supported by Spanish grants from CICYT (BIO2005-07592-C02-01) and MEC (CSD2006-0007), and by Fundación Severo Ochoa.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.virol.2007.07.021](https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.07.021).

References

- Acharya, R., Fry, E., Stuart, D., Fox, G., Rowlands, D., Brown, F., 1989. The three-dimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9 Å resolution. *Nature* 337 (6209), 709–716.
- Al-Younes, H.M., Rudel, T., Meyer, T.F., 1999. Characterization and intracellular trafficking pattern of vacuoles containing *Chlamydia pneumoniae* in human epithelial cells. *Cell. Microbiol.* 1 (3), 237–247.
- Baranowski, E., Sevilla, N., Verdager, N., Ruiz-Jarabo, C.M., Beck, E., Domingo, E., 1998. Multiple virulence determinants of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *J. Virol.* 72 (8), 6362–6372.
- Barteling, S.J., 2004. Modern inactivated foot-and-mouth disease (FMD) vaccines: historical background and key elements in production and use. In: Domingo, F.S.a.E. (Ed.), *Foot-and-Mouth Disease: Current Perspectives*. Horizon Bioscience, Norfolk.
- Baxt, B., 1987. Effect of lysosomotropic compounds on early events in foot-and-mouth disease virus replication. *Virus Res.* 7 (3), 257–271.
- Belsham, G.J., 2005. Translation and replication of FMDV RNA. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 288, 43–70.
- Berinstein, A., Roivainen, M., Hovi, T., Mason, P.W., Baxt, B., 1995. Antibodies to the vitronectin receptor (integrin alpha V beta 3) inhibit binding and infection of foot-and-mouth disease virus to cultured cells. *J. Virol.* 69 (4), 2664–2666.
- 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 (13), 8519–8534.
- Brown, F., 1998. Problems with BHK 21 cells. *Dev. Biol. Stand.* 93, 85–88.
- Bubeck, D., Filman, D.J., Hogle, J.M., 2005. Cryo-electron microscopy reconstruction of a poliovirus-receptor-membrane complex. *Nat. Struct., Mol. Biol.* 12 (7), 615–618.
- Burman, A., Clark, S., Abrescia, N.G., Fry, E.E., Stuart, D.I., Jackson, T., 2006.

- Specificity of the VP1 GH loop of foot-and-mouth disease virus for $\{\alpha\}$ v integrins. *J. Virol.* 80 (19), 9798–9810.
- Carrillo, E.C., Giachetti, C., Campos, R.H., 1984. Effect of lysosomotropic agents on the foot-and-mouth disease virus replication. *Virology* 135 (2), 542–545.
- Curry, S., Abrams, C.C., Fry, E., Crowther, J.C., Belsham, G.J., Stuart, D.I., King, A.M., 1995. Viral RNA modulates the acid sensitivity of foot-and-mouth disease virus capsids. *J. Virol.* 69 (1), 430–438.
- Chen, Y., Norkin, L.C., 1999. Extracellular simian virus 40 transmits a signal that promotes virus enclosure within caveolae. *Exp. Cell Res.* 246 (1), 83–90.
- Chinnapen, D.J., Chinnapen, H., Saslowsky, D., Lencer, W.I., 2007. Rafting with cholera toxin: endocytosis and trafficking from plasma membrane to ER. *FEMS Microbiol. Lett.* 266, 129–137.
- Chu, J.J., Ng, M.L., 2004. Interaction of West Nile virus with alpha v beta 3 integrin mediates virus entry into cells. *J. Biol. Chem.* 279 (52), 54533–54541.
- Chung, S.K., Kim, J.Y., Kim, I.B., Park, S.I., Paek, K.H., Nam, J.H., 2005. Internalization and trafficking mechanisms of coxsackievirus B3 in HeLa cells. *Virology* 333 (1), 31–40.
- Damm, E.M., Pelkmans, L., 2006. Systems biology of virus entry in mammalian cells. *Cell. Microbiol.* 8 (8), 1219–1227.
- Damm, E.M., Pelkmans, L., Kartenbeck, J., Mezzacasa, A., Kurzchalia, T., Helenius, A., 2005. Clathrin- and caveolin-1-independent endocytosis: entry of simian virus 40 into cells devoid of caveolae. *J. Cell Biol.* 168 (3), 477–488.
- Danthi, P., Chow, M., 2004. Cholesterol removal by methyl-beta-cyclodextrin inhibits poliovirus entry. *J. Virol.* 78 (1), 33–41.
- DeTulio, L., Kirchhausen, T., 1998. The clathrin endocytic pathway in viral infection. *EMBO J.* 17 (16), 4585–4593.
- Dimitrov, D.S., 2004. Virus entry: molecular mechanisms and biomedical applications. *Nat. Rev., Microbiol.* 2 (2), 109–122.
- Domingo, E., Escarmis, C., Baranowski, E., Ruiz-Jarabo, C.M., Carrillo, E., Nunez, J.I., Sobrino, F., 2003. Evolution of foot-and-mouth disease virus. *Virus Res.* 91 (1), 47–63.
- García-Briones, M., Rosas, M.F., Gonzalez-Magaldi, M., Martín-Acebes, M.A., Sobrino, F., Armas-Portela, R., 2006. Differential distribution of non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus in BHK-21 cells. *Virology* 349 (2), 409–421.
- Gilbert, J.M., Benjamin, T.L., 2000. Early steps of polyomavirus entry into cells. *J. Virol.* 74 (18), 8582–8588.
- Hewat, E.A., Verdague, N., Fita, I., Blakemore, W., Brookes, S., King, A., Newman, J., Domingo, E., Mateu, M.G., Stuart, D.I., 1997. Structure of the complex of an Fab fragment of a neutralizing antibody with foot-and-mouth disease virus: positioning of a highly mobile antigenic loop. *EMBO J.* 16 (7), 1492–1500.
- Hogle, J.M., 2002. Poliovirus cell entry: common structural themes in viral cell entry pathways. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 677–702.
- Huber, M., Brabec, M., Bayer, N., Blaas, D., Fuchs, R., 2001. Elevated endosomal pH in HeLa cells overexpressing mutant dynamin can affect infection by pH-sensitive viruses. *Traffic* 2 (10), 727–736.
- Iversen, T.G., Skretting, G., van Deurs, B., Sandvig, K., 2003. Clathrin-coated pits with long, dynamin-wrapped necks upon expression of a clathrin antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (9), 5175–5180.
- Jackson, T., Sheppard, D., Denyer, M., Blakemore, W., King, A.M., 2000. The epithelial integrin alphavbeta6 is a receptor for foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* 74 (11), 4949–4956.
- Jackson, T., Mould, A.P., Sheppard, D., King, A.M., 2002. Integrin alphavbeta1 is a receptor for foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* 76 (3), 935–941.
- Jackson, T., Clark, S., Berryman, S., Burman, A., Cambier, S., Mu, D., Nishimura, S., King, A.M., 2004. Integrin alphavbeta8 functions as a receptor for foot-and-mouth disease virus: role of the beta-chain cytodomain in integrin-mediated infection. *J. Virol.* 78 (9), 4533–4540.
- Joki-Korpela, P., Marjomaki, V., Krogerus, C., Heino, J., Hyypia, T., 2001. Entry of human parechovirus 1. *J. Virol.* 75 (4), 1958–1967.
- Keller, P., Simons, K., 1998. Cholesterol is required for surface transport of influenza virus hemagglutinin. *J. Cell Biol.* 140 (6), 1357–1367.
- Kurzchalia, T.V., Dupree, P., Monier, S., 1994. VIP21-Caveolin, a protein of the trans-Golgi network and caveolae. *FEBS Lett.* 346 (1), 88–91.
- Lakadamyali, M., Rust, M.J., Zhuang, X., 2006. Ligands for clathrin-mediated endocytosis are differentially sorted into distinct populations of early endosomes. *Cell* 124 (5), 997–1009.
- Lamaze, C., Dujancourt, A., Baba, T., Lo, C.G., Benmerah, A., Dautry-Varsat, A., 2001. Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. *Mol. Cell* 7 (3), 661–671.
- Lea, S., Hernandez, J., Blakemore, W., Brocchi, E., Curry, S., Domingo, E., Fry, E., Abu-Ghazaleh, R., King, A., Newman, J., et al., 1994. The structure and antigenicity of a type C foot-and-mouth disease virus. *Structure* 2 (2), 123–139.
- Le Blanc, I., Luyet, P.P., Pons, V., Ferguson, C., Emans, N., Petiot, A., Mayran, N., Demaurex, N., Faure, J., Sadoul, R., Parton, R.G., Gruenberg, J., 2005. Endosome-to-cytosol transport of viral nucleocapsids. *Nat. Cell Biol.* 7 (7), 653–664.
- Lefrançois, L., Lyles, D.S., 1982. The interaction of antibody with the major surface glycoprotein of vesicular stomatitis virus. II. Monoclonal antibodies of nonneutralizing and cross-reactive epitopes of Indiana and New Jersey serotypes. *Virology* 121 (1), 168–174.
- Lukacs, G.L., Segal, G., Kartner, N., Grinstein, S., Zhang, F., 1997. Constitutive internalization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator occurs via clathrin-dependent endocytosis and is regulated by protein phosphorylation. *Biochem. J.* 328 (Pt 2), 353–361.
- Marjomaki, V., Pietiainen, V., Matilainen, H., Upla, P., Ivaska, J., Nissinen, L., Reunanen, H., Huttunen, P., Hyypia, T., Heino, J., 2002. Internalization of echovirus 1 in caveolae. *J. Virol.* 76 (4), 1856–1865.
- Marsh, M., Helenius, A., 2006. Virus entry: open sesame. *Cell* 124 (4), 729–740.
- Mateu, M.G., 1995. Antibody recognition of picornaviruses and escape from neutralization: a structural view. *Virus Res.* 38 (1), 1–24.
- Mateu, M.G., Rocha, E., Vicente, O., Vayreda, F., Navalpotro, C., Andreu, D., Pedrosa, E., Giral, E., Enjuanes, L., Domingo, E., 1987. Reactivity with monoclonal antibodies of viruses from an epistome of foot-and-mouth disease. *Virus Res.* 8 (3), 261–274.
- Matlin, K.S., Reggio, H., Helenius, A., Simons, K., 1982. Pathway of vesicular stomatitis virus entry leading to infection. *J. Mol. Biol.* 156 (3), 609–631.
- Millan, J., Puertollano, R., Fan, L., Alonso, M.A., 1997. Caveolin and MAL, two protein components of internal detergent-insoluble membranes, are in distinct lipid microenvironments in MDCK cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 233 (3), 707–712.
- Monaghan, P., Gold, S., Simpson, J., Zhang, Z., Weinreb, P.H., Violette, S.M., Alexandersen, S., Jackson, T., 2005. The alpha(v)beta6 integrin receptor for Foot-and-mouth disease virus is expressed constitutively on the epithelial cells targeted in cattle. *J. Gen. Virol.* 86 (Pt 10), 2769–2780.
- Neff, S., Sa-Carvalho, D., Rieder, E., Mason, P.W., Blystone, S.D., Brown, E.J., Baxt, B., 1998. Foot-and-mouth disease virus virulent for cattle utilizes the integrin alpha(v)beta3 as its receptor. *J. Virol.* 72 (5), 3587–3594.
- Nicola, A.V., McEvoy, A.M., Straus, S.E., 2003. Roles for endocytosis and low pH in herpes simplex virus entry into HeLa and Chinese hamster ovary cells. *J. Virol.* 77 (9), 5324–5332.
- Nunez, J.I., Baranowski, E., Molina, N., Ruiz-Jarabo, C.M., Sanchez, C., Domingo, E., Sobrino, F., 2001. A single amino acid substitution in nonstructural protein 3A can mediate adaptation of foot-and-mouth disease virus to the guinea pig. *J. Virol.* 75 (8), 3977–3983.
- 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 (13), 8506–8518.
- Oh, P., McIntosh, D.P., Schnitzer, J.E., 1998. Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium. *J. Cell Biol.* 141 (1), 101–114.
- Pelkmans, L., Fava, E., Grabner, H., Hannus, M., Habermann, B., Krausz, E., Zerial, M., 2005. Genome-wide analysis of human kinases in clathrin- and caveolae/raft-mediated endocytosis. *Nature* 436 (7047), 78–86.
- Peres, C., Yart, A., Perret, B., Salles, J.P., Raynal, P., 2003. Modulation of phosphoinositide 3-kinase activation by cholesterol level suggests a novel positive role for lipid rafts in lysophosphatidic acid signalling. *FEBS Lett.* 534 (1–3), 164–168.

- Pietäinen, V., Marjomaki, V., Upla, P., Pelkmans, L., Helenius, A., Hyypia, T., 2004. Echovirus 1 endocytosis into caveosomes requires lipid rafts, dynamin II, and signaling events. *Mol. Biol. Cell* 15 (11), 4911–4925.
- Richterova, Z., Liebl, D., Horak, M., Palkova, Z., Stokrova, J., Hozak, P., Korb, J., Forstova, J., 2001. Caveolae are involved in the trafficking of mouse polyomavirus virions and artificial VP1 pseudocapsids toward cell nuclei. *J. Virol.* 75 (22), 10880–10891.
- Rigaut, K.D., Birk, D.E., Lenard, J., 1991. Intracellular distribution of input vesicular stomatitis virus proteins after uncoating. *J. Virol.* 65 (5), 2622–2628.
- Rodal, S.K., Skretting, G., Garred, O., Vilhardt, F., van Deurs, B., Sandvig, K., 1999. Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles. *Mol. Biol. Cell* 10 (4), 961–974.
- Roseberry, A.G., Hosey, M.M., 2001. Internalization of the M2 muscarinic acetylcholine receptor proceeds through an atypical pathway in HEK293 cells that is independent of clathrin and caveolae. *J. Cell Sci.* 114 (Pt 4), 739–746.
- Rowlands, D.J., 2003. Foot-and-mouth disease. Special issue. *Virus Res.* 91 (1).
- Sandvig, K., Olsnes, S., Petersen, O.W., van Deurs, B., 1987. Acidification of the cytosol inhibits endocytosis from coated pits. *J. Cell Biol.* 105 (2), 679–689.
- Schober, D., Kronenberger, P., Prchla, E., Blaas, D., Fuchs, R., 1998. Major and minor receptor group human rhinoviruses penetrate from endosomes by different mechanisms. *J. Virol.* 72 (2), 1354–1364.
- Sieczkarski, S.B., Whittaker, G.R., 2002a. Dissecting virus entry via endocytosis. *J. Gen. Virol.* 83 (Pt 7), 1535–1545.
- Sieczkarski, S.B., Whittaker, G.R., 2002b. Influenza virus can enter and infect cells in the absence of clathrin-mediated endocytosis. *J. Virol.* 76 (20), 10455–10464.
- Sieczkarski, S.B., Whittaker, G.R., 2005. Viral entry. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 285, 1–23.
- Simons, K., Ikonen, E., 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387 (6633), 569–572.
- Skretting, G., Torgersen, M.L., van Deurs, B., Sandvig, K., 1999. Endocytic mechanisms responsible for uptake of GPI-linked diphtheria toxin receptor. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 22), 3899–3909.
- Smith, A.E., Helenius, A., 2004. How viruses enter animal cells. *Science* 304 (5668), 237–242.
- Snyers, L., Zwickl, H., Blaas, D., 2003. Human rhinovirus type 2 is internalized by clathrin-mediated endocytosis. *J. Virol.* 77 (9), 5360–5369.
- Sobrinho, F., Davila, M., Ortin, J., Domingo, E., 1983. Multiple genetic variants arise in the course of replication of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *Virology* 128 (2), 310–318.
- Sobrinho, F., Domingo, E. (Eds.), 2004. Foot-and-Mouth Disease. Current Perspectives. Horizon Bioscience, Norfolk, UK.
- Stuart, A.D., Eustace, H.E., McKee, T.A., Brown, T.D., 2002. A novel cell entry pathway for a DAF-using human enterovirus is dependent on lipid rafts. *J. Virol.* 76 (18), 9307–9322.
- Subtil, A., Gaidarov, I., Kobylarz, K., Lampson, M.A., Keen, J.H., McGraw, T.E., 1999. Acute cholesterol depletion inhibits clathrin-coated pit budding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (12), 6775–6780.
- Sun, X., Yau, V.K., Briggs, B.J., Whittaker, G.R., 2005. Role of clathrin-mediated endocytosis during vesicular stomatitis virus entry into host cells. *Virology* 338 (1), 53–60.
- Sutmoller, P., Barteling, S.S., Olascoaga, R.C., Sumption, K.J., 2003. Control and eradication of foot-and-mouth disease. *Virus Res.* 91 (1), 101–144.
- Toja, M., Escarmis, C., Domingo, E., 1999. Genomic nucleotide sequence of a foot-and-mouth disease virus clone and its persistent derivatives. Implications for the evolution of viral quasispecies during a persistent infection. *Virus Res.* 64 (2), 161–171.
- Torgersen, M.L., Skretting, G., van Deurs, B., Sandvig, K., 2001. Internalization of cholera toxin by different endocytic mechanisms. *J. Cell Sci.* 114 (Pt. 20), 3737–3747.
- Upla, P., Marjomaki, V., Kankaanpää, P., Ivaska, J., Hyypia, T., Van Der Goot, F. G., Heino, J., 2004. Clustering induces a lateral redistribution of alpha 2 beta 1 integrin from membrane rafts to caveolae and subsequent protein kinase C-dependent internalization. *Mol. Biol. Cell* 15 (2), 625–636.
- Urs, N.M., Jones, K.T., Salo, P.D., Severin, J.E., Trejo, J., Radhakrishna, H., 2005. A requirement for membrane cholesterol in the beta-arrestin- and clathrin-dependent endocytosis of LPA1 lysophosphatidic acid receptors. *J. Cell Sci.* 118 (Pt. 22), 5291–5304.
- van Vlijmen, H.W., Curry, S., Schaefer, M., Karplus, M., 1998. Titration calculations of foot-and-mouth disease virus capsids and their stabilities as a function of pH. *J. Mol. Biol.* 275 (2), 295–308.
- Verdaguer, N., Mateu, M.G., Andreu, D., Giralt, E., Domingo, E., Fita, I., 1995. Structure of the major antigenic loop of foot-and-mouth disease virus complexed with a neutralizing antibody: direct involvement of the Arg-Gly-Asp motif in the interaction. *EMBO J.* 14 (8), 1690–1696.
- Wetley, F.R., Hawkins, S.F., Stewart, A., Luzio, J.P., Howard, J.C., Jackson, A.P., 2002. Controlled elimination of clathrin heavy-chain expression in DT40 lymphocytes. *Science* 297 (5586), 1521–1525.

Subcellular distribution of swine vesicular disease virus proteins and alterations induced in infected cells: A comparative study with foot-and-mouth disease virus and vesicular stomatitis virus[☆]

Miguel A. Martín-Acebes^a, Mónica González-Magaldi^a, María F. Rosas^a, Belén Borrego^b, Emiliana Brocchi^c, Rosario Armas-Portela^{a,d,†}, Francisco Sobrino^{a,b,*}

^a Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM), Cantoblanco 28049, Madrid, Spain

^b Centro de Investigación en Sanidad Animal, INIA, Valdeolmos, 28130 Madrid, Spain

^c Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell’Emilia Romagna (IZSLER), 25124 Brescia, Italy

^d Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

Received 7 November 2007; returned to author for revision 4 December 2007; accepted 30 December 2007

Available online 14 February 2008

Abstract

The intracellular distribution of swine vesicular disease virus (SVDV) proteins and the induced reorganization of endomembranes in IBRS-2 cells were analyzed. Fluorescence to new SVDV capsids appeared first upon infection, concentrated in perinuclear circular structures and colocalized to dsRNA. As in foot-and-mouth disease virus (FMDV)-infected cells, a vesicular pattern was predominantly found in later stages of SVDV capsid morphogenesis that colocalized with those of non-structural proteins 2C, 2BC and 3A. These results suggest that assembly of capsid proteins is associated to the replication complex. Confocal microscopy showed a decreased fluorescence to ER markers (calreticulin and protein disulfide isomerase), and disorganization of *cis*-Golgi gp74 and *trans*-Golgi caveolin-1 markers in SVDV- and FMDV-, but not in vesicular stomatitis virus (VSV)-infected cells. Electron microscopy of SVDV-infected cells at an early stage of infection revealed fragmented ER cisternae with expanded lumen and accumulation of large Golgi vesicles, suggesting alterations of vesicle traffic through Golgi compartments. At this early stage, FMDV induced different patterns of ER fragmentation and Golgi alterations. At later stages of SVDV cytopathology, cells showed a completely vacuolated cytoplasm containing vesicles of different sizes. Cell treatment with brefeldin A, which disrupts the Golgi complex, reduced SVDV (~5 log) and VSV (~4 log) titers, but did not affect FMDV growth. Thus, three viruses, which share target tissues and clinical signs in natural hosts, induce different intracellular effects in cultured cells. © 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: SVDV; Infection; Proteins; Subcellular distribution; Endomembranes; Brefeldin A; FMDV; VSV

Introduction

Swine vesicular disease virus (SVDV) is a member of the genus *Enterovirus* within the family *Picornaviridae* and it is assumed to be derived from the human pathogen coxsackievirus B5 (CVB5) (Zhang et al., 1993, 1999). SVDV is the aetiological agent of an important and highly contagious disease of pigs

(SVD). Outbreaks have periodically affected Europe and East Asia (Brocchi et al., 1997; Knowles et al., 2007; Lin and Kitching, 2000) since SVD was first reported in Italy in 1966 (Nardelli et al., 1968). In contrast to human coxsackievirus, which are the responsible for myocarditis, pancreatitis and meningitis (Whitton et al., 2005), SVDV tropism is related to epithelial tissues (Mulder et al., 1997). Since SVDV and CVB are able to use the same cellular receptors (Jimenez-Clavero et al., 2005), differences in viral tropism may be a consequence of post-entry factors (Whitton et al., 2005). The vesicular lesions produced by SVDV are indistinguishable from those caused by foot-and-mouth disease virus (FMDV), another picornavirus that belongs to the genus *Aphthovirus* (Rowlands, 2003; Sobrino and Domingo, 2004),

[☆] Dedicated to the memory of Rosario Armas-Portela.

* Corresponding author. CBMSO, UAM, Cantoblanco 28049, Madrid, Spain. Fax: +34 91 1964420.

E-mail address: fsobrino@cbm.uam.es (F. Sobrino).

† Deceased.

and vesicular stomatitis virus (VSV), a member of the genus *Vesiculovirus*, family *Rhabdoviridae* (Letchworth et al., 1999; Lin and Kitching, 2000). Although SVDV does not usually produce a severe disease, the need for a differential diagnosis with FMD makes this virus important for international trade as reflected by its inclusion in the list of diseases notifiable to the OIE.

SVDV and FMDV genomes are composed of a single-stranded RNA molecule of positive polarity that is translated using an internal ribosome entry site (IRES) to produce a polyprotein. This polyprotein is then processed into mature viral proteins (Belsham and Martínez-Salas, 2004; Escribano-Romero et al., 2000; Zhang et al., 1993). The four structural proteins (VP1–VP4) conform an icosahedral capsid of approximately 25–30 nm in diameter. Seven non-structural (NS) proteins (and some of their precursors) are implicated in viral cycle: 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C and 3D, plus L protein in the case of FMDV (Buenz and Howe, 2006; Whitton et al., 2005). Among them, L, 2A and 3C are the proteases that catalyze polyprotein processing to yield mature viral proteins. 3D is an RNA dependent RNA polymerase and 3B (VPg) is a peptide which links covalently to the 5' end of viral genome. The SVDV genome encodes a single copy of 3B gene. Three tandem copies are present in the FMDV RNA (Forss et al., 1984). Hydrophobic domains for membrane anchor are predicted for 2B, 2C and 3A proteins (Echeverri and Dasgupta, 1995; Towner et al., 1996; van Kuppeveld et al., 1996; Wessels et al., 2006c).

Studies performed mainly with poliovirus (PV) have revealed that picornavirus RNA replication takes place at the surface of cytoplasmic vesicles derived from cellular membranes of endoplasmic reticulum (ER) and the Golgi complex (Bienz et al., 1987; Garcia-Briones et al., 2006; Knox et al., 2005; O'Donnell et al., 2001; Schlegel et al., 1996; Suhy et al., 2000). Picornavirus infection impairs protein trafficking along the secretory pathway (Cornell et al., 2006; Doedens and Kirkegaard, 1995; Moffat et al., 2005) and inhibits host cell protein and RNA synthesis (Ehrenfeld, 1982; Holland, 1962). The differences in the morphology of cytoplasmic vesicles induced in infected cells and in the sensitivity to the Golgi disrupting agent brefeldin A (BFA) suggest diverse cellular requirements among picornaviruses to build the replication complex (Gazina et al., 2002; Moffat et al., 2005; Monaghan et al., 2004; Wessels et al., 2006a).

Although SVDV was described forty years ago, most aspects of its interaction with host cells remain undetermined and they are assumed to be similar to those described for other enteroviruses, mainly PV. In this study, we have performed a comparative analysis of the reorganizations induced by SVDV infection on the ER and Golgi architecture by using confocal and electron microscopy analyses. The alterations found were compared with those produced by two important animal vesicular viruses: FMDV and VSV, the effects induced in cultured cells by the latter being well established (Letchworth et al., 1999). Experiments were performed in a cell line IBRS-2 susceptible to these three viruses. Our results support that SVDV infection disassembles the ER and the Golgi and that viral replication takes place at the surface of cytoplasmic vesicles likely originated from these cell structures. The alterations induced by FMDV were in part similar to those

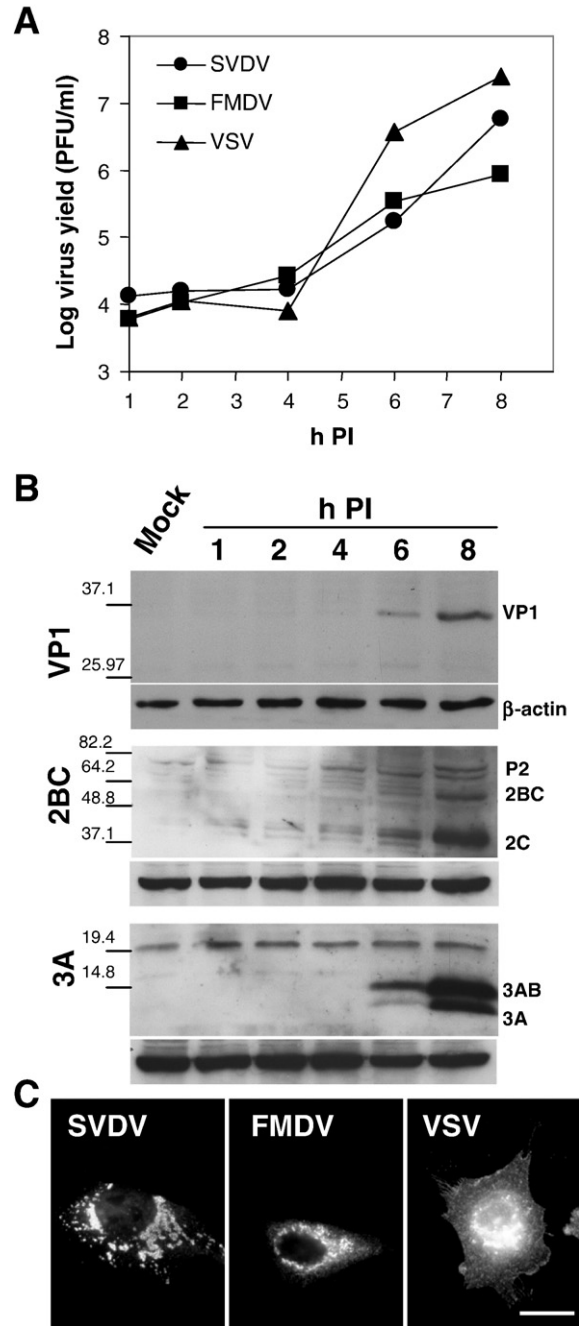
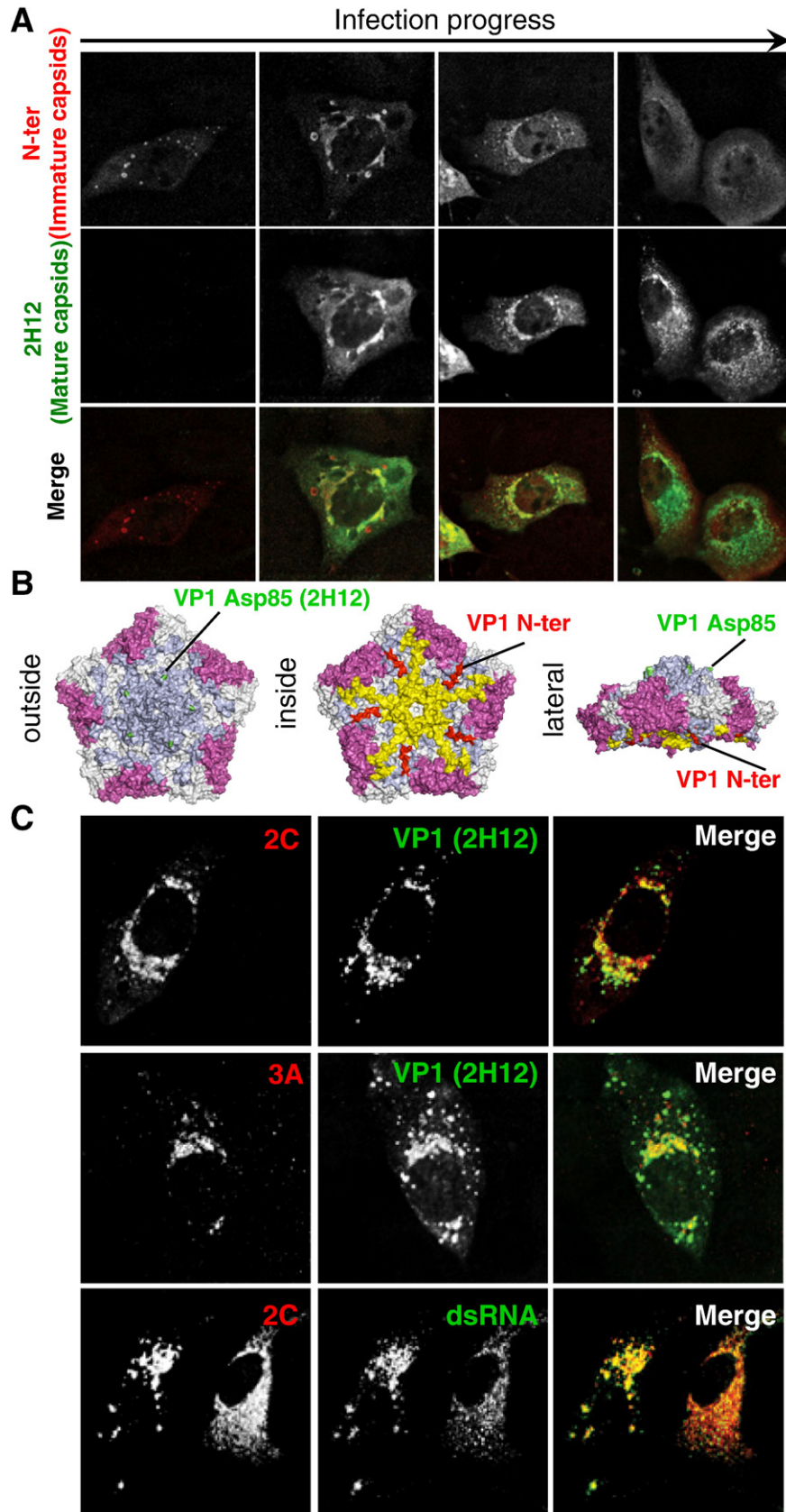


Fig. 1. SVDV, FMDV and VSV efficiently infect IBRS-2 cells. A) Single step growth curve of the three viruses. IBRS-2 cells were infected (MOI of 0.5) and at different times PI supernatant virus yield was determined by plaque assay. B) Time-course of accumulation of SVDV proteins in infected cells. Mock and SVDV-infected cells (as in A) were lysed and viral proteins were detected by Western-blotting using rabbit polyclonal antisera against the N-terminus of SVDV VP1, and to 2BC or 3A proteins from CVB3. Cellular β -actin is shown as control of protein loading. Expected protein molecular weights (in kDa): VP1 (31.6), 2C (37.3), 2BC (48.3), P2 (64.7), 3A (9.89) and 3AB (12.3). C) Representative examples of immunofluorescence patterns of infected cells. Infected cells (MOI of 0.5) were processed for immunofluorescence at 8 h PI, using MAbs 2H12, SD6 and I1 to detect SVDV or FMDV VP1 proteins or VSV-G protein, respectively, and a secondary antibody coupled to Alexa Fluor 594. Bar: 20 μ m.

caused by FMDV, while VSV did not disassemble ER or Golgi complex. Differences were also found in the sensitivity to BFA as it did not affect FMDV growth, but highly inhibited SVDV

and VSV infections. Overall, these results suggest differential requirements to build the replication complex among the three viruses studied.



Results

SVDV, FMDV and VSV infect IBRS-2 cells

Each of the viruses studied productively grew in IBRS-2 cells (Fig. 1A), showing a parallel time-course and producing a morphologically similar cytopathic effect (data not shown). When the time-course of SVDV protein detection was studied by Western-blotting, a protein band of the expected size was revealed by the antibody to N-ter of VP1. The protein band recognized by antibody N-ter was first detected at 6 h PI, being more intense at 8 h PI (Fig. 1B). Antiserum to 2BC from the related CVB3 recognized SVDV 2C, 2BC and P2 precursor at 8 h PI. This antibody did not recognize protein 2B as described (Cornell et al., 2006). Similar results were obtained using an anti-CVB3 2C antibody (data not shown). Likewise, the antibody to CVB3 3A detected, from 6 h PI, a protein band which size corresponded to that of SVDV 3A and an additional band of a mobility compatible with that of precursor 3AB (Fig. 1B). The Western-blot detection of the SVDV proteins analyzed was delayed when compared to FMDV-infected cells (Fig. S1 in Supplementary data, and data not shown). Fluorescence studies were performed at 8 h PI of cells infected with a low MOI of about 0.5, which allowed detection of cells with different degrees of infection progress for the three viruses compared. Infected cells showed specific fluorescence to epitopes exposed in mature viral capsids, corresponding to the structural protein VP1 for SVDV (2H12) and FMDV (Mab SD6) or to the G glycoprotein for VSV (Mab I1), and representative images are shown in Fig. 1C. In average, emergence of fluorescence was delayed in SVDV-infected cells (from 4–5 h PI) when compared to cells infected with FMDV or VSV (from 2.5 to 3 h PI) (data not shown). Fluorescence to Mab 2H12 in SVDV-infected cells showed a vesicular perinuclear pattern combined with a cytoplasmic granular distribution. As described for other FMDV-infected cell lines (García-Briones et al., 2006; Knox et al., 2005), VP1 distribution in IBRS-2 infected cells was more diffuse and appeared concentrated in smaller vesicles with a preferential perinuclear location (García-Briones et al., 2006; Monaghan et al., 2004). In VSV-infected cells, G protein accumulated perinuclearly and also at the cell periphery. A similar distribution was reported for BHK-21 infected cells (Arnheiter et al., 1984). This distribution likely corresponds to part of the ER and Golgi complexes and the plasma membrane where newly synthesized virions acquire their envelope (de Silva et al., 1990; Odenwald et al., 1986).

Intracellular location of SVDV capsid proteins

Two antibodies that recognized epitopes differentially exposed in SVDV capsid intermediates were used to study the emergence and location of capsid proteins in infected cells. Antibody to the N-terminus of VP1 recognizes an internal epitope that only becomes accessible following the conformational rearrangements induced by the interaction of the virion with cell receptors (Jimenez-Clavero et al., 2001). N-ter also reacts with denatured SVDV VP1 protein in Western-blotting (Fig. 1B), suggesting that this antibody is able to detect unfolded forms of SVDV capsid precursors. On the other hand, Mab 2H12 recognized a discontinuous epitope that is exposed in mature capsids and virions at later stages of viral morphogenesis (Borrego et al., 2002; Jimenez-Clavero et al., 2001) (Fig. 2A). Fig. 2B shows the location on a SVDV capsid pentamer model of the VP1 residues used to produce antibody N-ter, and of the VP1 residue where replacements in mutants escaping neutralization by Mab 2H12 were found (Borrego et al., 2002). Double immunofluorescence labelling experiments performed at 8 h PI in SVDV-infected cells (MOI of 0.5), allowed detection of SVDV-infected cells positive for antibody N-ter that did not show fluorescence to the discontinuous epitope recognized by Mab 2H12 (Fig. 2A). This fluorescence was considered to correspond to capsid precursors antigenically similar to the modified virions generated following the interaction with cell receptors, termed immature capsids. In cells showing this early pattern, fluorescence of antibody N-ter was concentrated in perinuclear circular structures, including “ring-like” images that likely corresponded to the surface of vesicles where de novo capsid protein synthesis takes place. As infection progressed, an increase in a perinuclear and granular cytoplasmic accumulation of fluorescence to the discontinuous epitope recognized by Mab 2H12 was observed and colocalized to antibody N-ter. Concomitantly, a fading and more diffuse staining with antibody N-ter was observed (see merge images in Fig. 2A). In order to confirm that these patterns represented different infection stages, we performed infections at high MOI, in an attempt to synchronize infection, and fixed cells at defined time intervals. Cells showing only fluorescence for N-ter antibody accounted for 80% of the total positive cells at 3.5 h PI. This ratio drastically reduced from 5 h PI, when at least 90% of positive cells showed fluorescence to Mab 2H12 (Fig. S2, Supplementary data). Remarkably under these experimental conditions not all the cells in the culture showed equal levels of protein accumulation and cytopathic effect, confirming the asynchronous progress of SVDV infection. In some instances

Fig. 2. Subcellular distribution of fluorescence to immature and mature capsids and to NS proteins in SVDV-infected cells. A) Confocal sections of representative immunofluorescence patterns shown by IBRS-2 cells infected with SVDV (8 h PI). Cells were infected (MOI of 0.5) and immunostained using rabbit antiserum N-ter (red) and Mab 2H12 (green). Images were ordered to represent different stages of infection, based on the relative intensity of fluorescence to Mab 2H12. B) Location of the amino acids contributing to the epitopes recognized by antibody N-ter and Mab 2H12 on a SVDV capsid pentamer model (Verdaguer et al., 2003) (PDB accession number: 1mqf), created using oligomer generator at Viperdb (Shepherd et al., 2006). The VP1 residue Asp 85, functionally involved in the epitope recognized by Mab 2H12 (Borrego et al., 2002), is indicated in green; the sequence of the 20 N-terminal VP1 residues used to produce antibody N-ter is shown in red (Jimenez-Clavero et al., 2001). VP1 (blue), VP2 (white), VP3 (magenta) and VP4 (yellow). C) Confocal sections of cells infected and processed as in (A), using polyclonal sera to 2C or 3A CVB3 proteins (red) in combination with Mab 2H12 to VP1 (green), or Mab J2 to dsRNA (green). Yellow fluorescence denotes colocalization in the merged images.

confocal images of IBRS-2 infected cells showed fluorescence to MAb 2H12 at ring-like structures of lower size than those observed with antibody N-ter (Fig. S4, Supplementary data). Similar results were obtained in double immunofluorescences combining antibody N-ter and MAb 5C4; the latter recognizing a conformational epitope only exposed in mature SVDV capsids, for which mutants escaping neutralization showed mutations at VP3 protein (Borrego et al., 2002) (Fig. S3, Supplementary data).

SVDV capsids assemble close to replication site

SVDV NS proteins were detected by antibodies specific for CVB3 2C, 2BC and 3A (Fig. 2C and Fig. S5A in Supplementary data). These proteins were mainly located perinuclearly and exhibited a punctuated pattern. Their fluorescence colocalized with that of mature capsids recognized by MAb 2H12, suggesting that SVDV capsid maturation occurred close to the replication complex as described for other picornaviruses (Egger et al., 2000; Krogerus et al., 2003). This possibility was supported by double labelling experiments with a MAb to dsRNA whose accumulation at the replication complexes built by other picornaviruses has been reported (Gazina et al., 2002). The confocal sections analyzed showed a punctuated perinuclear pattern corresponding to dsRNA in SVDV-infected cells, but not in mock-infected cells (Fig. 2C and Fig. S5B in Supplementary data). Fluorescence to dsRNA colocalized with SVDV NS proteins 2B, 2BC and 3A, as well as with immature capsids recognized by antibody N-ter.

Alterations induced on ER and Golgi morphology by SVDV infection

Picornavirus replication takes place associated to cellular membranes (see Introduction), so we investigated the effects of SVDV infection on the ER and Golgi structures and compared them with those produced by FMDV and VSV. Infected cells which showed major morphological effects were not considered in these analyses as these alterations impaired recognition and comparison of cell structures. Confocal microscopy of SVDV-infected cells using antibodies to ER markers showed decreased fluorescence intensity against calreticulin and PDI when compared with mock-infected cells (Fig. 3A). A parallel decrease in fluorescence to PDI was observed in FMDV-infected cells, while the calreticulin pattern was shown perinuclearly dispersed (Fig. 3B). Conversely, in VSV-infected cells, calreticulin staining appeared perinuclearly concentrated (Fig. 3C). In this case the intensity of the fluorescence allowed the analysis of thinner sections that revealed the colocalization of VSV-G protein and calreticulin.

SVDV infection of IBRS-2 cells dispersed and reduced the fluorescence intensity to the *cis*-Golgi complex marker gp74 (Fig. 4A). This Golgi alteration was also observed in FMDV-infected cells (Fig. 4B), as previously described for BHK-21 infected cells (García-Briones et al., 2006). Likewise the perinuclear accumulation of caveolin-1, a protein that resides at the *trans*-Golgi and cycles through caveolae at plasma

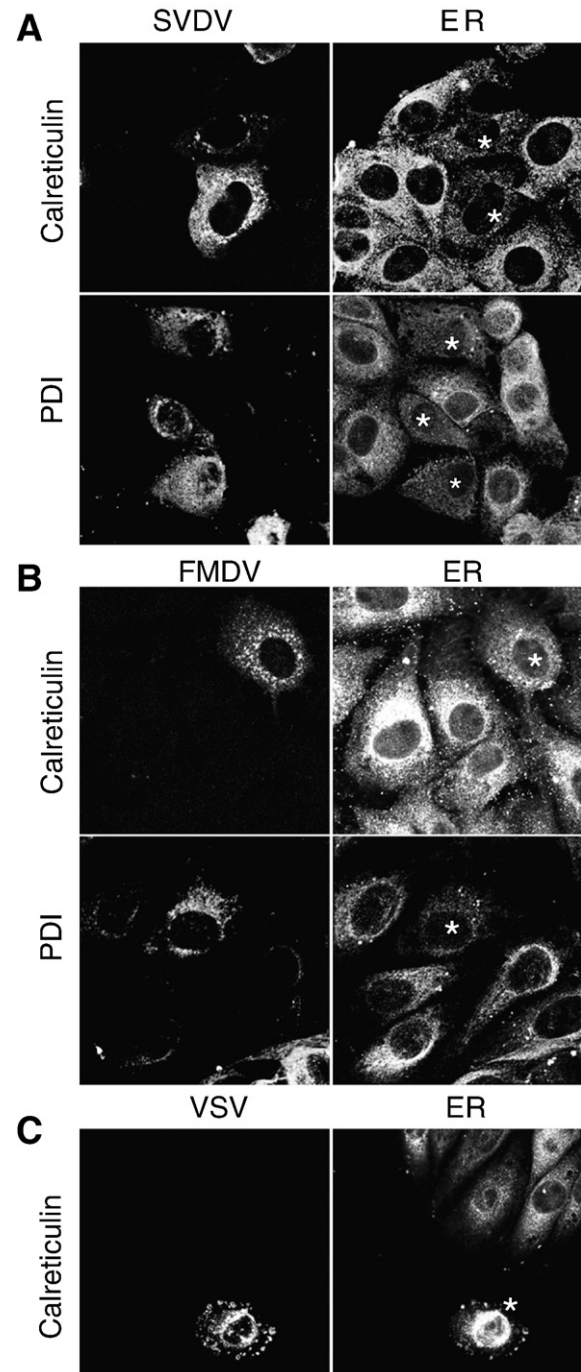


Fig. 3. SVDV, FMDV or VSV infection induces different effects on ER. Optical sections of IBRS-2 cells infected with SVDV, FMDV or VSV (MOI of 0.5) and processed for double immunofluorescence, at 8 h PI, using rabbit polyclonal antiserum to calreticulin or MAb 1D3 to PDI and the corresponding virus-specific antibodies 2H12, SD6 and I1 or N-ter and VP1, respectively. A) Changes in ER pattern fluorescence induced by SVDV infection. B) FMDV infection disperses and decreases ER fluorescence. C) Changes in the ER pattern fluorescence induced by VSV infection. Asterisks denote infected cells.

membrane (Kurzchalia et al., 1994), was also dispersed in SVDV and FMDV-infected cells confirming the ER disruption. In contrast, VSV infection did not alter the caveolin-1 staining pattern of the Golgi (Fig. 4C).

Ultrastructural changes in SVDV-infected cells

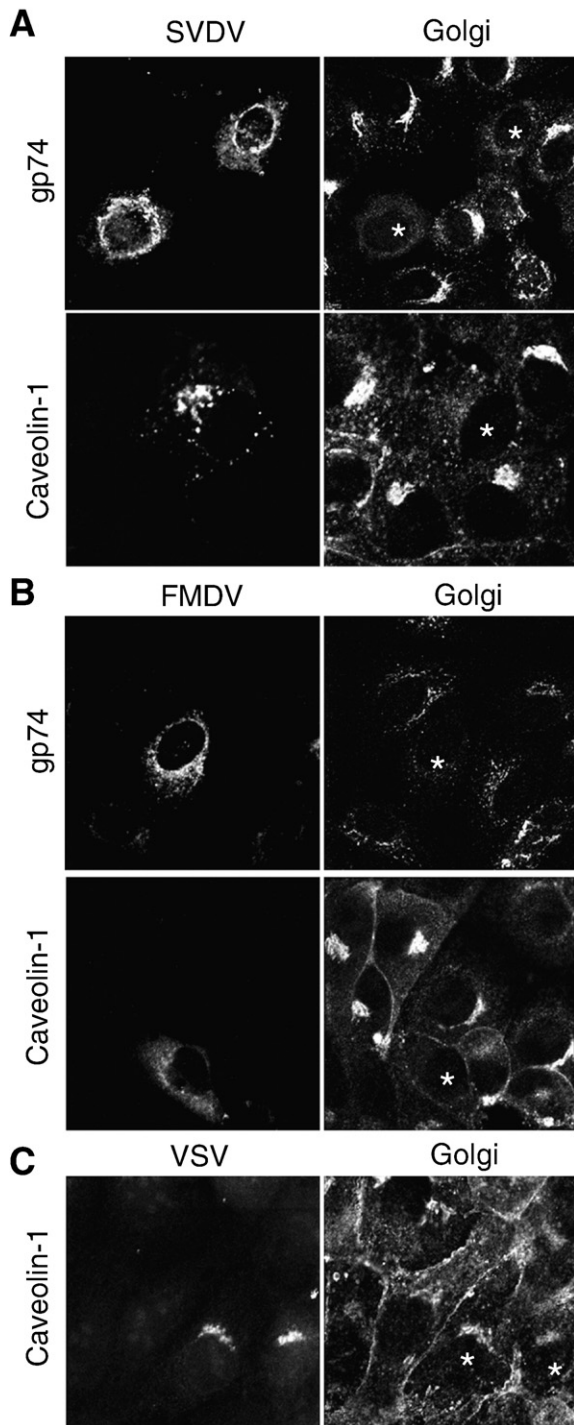


Fig. 4. SVDV, FMDV or VSV infection induces different effects on the Golgi. Optical sections of IBRS-2 cells infected with SVDV, FMDV or VSV (MOI of 0.5) and processed for double immunofluorescence, at 8 h PI, using MAb 25H8 to gp74 (*cis*-Golgi marker) or anti-caveolin-1 rabbit polyclonal serum (*trans*-Golgi marker) and the corresponding virus-specific antibodies 2H12, SD6 and I1 or N-ter and VP1, respectively. A) Golgi dispersion induced by SVDV infection. B) FMDV infection disperses Golgi. C) VSV infection does not alter Golgi staining pattern. Asterisks denote infected cells.

The differences in the alterations induced at the ER and Golgi complexes by the infection of IBRS-2 cells with SVDV or FMDV were further analyzed by TEM. Infections were performed at high MOI and cells were analyzed when the cytopathic effect was evident: 6 h PI for FMDV and 8 h PI for SVDV (Fig. 5). Two populations of SVDV-infected cells could be distinguished. One with cells exhibiting a low cytopathic effect, and a second population defined by rounded cells showing advanced cytopathic effect that was assumed to correspond to late stages of infection. In cells presenting low cytopathic effect (Fig. 5A) it was possible to identify the different cell compartments. As reported for BHK-21 cells (Monaghan et al., 2004), two populations of FMDV-infected IBRS-2 cells could be identified. Those that exhibited low cytopathology and those with an advanced cytopathology that detached from the plates. Thus, a comparative study of the changes on intracellular architecture induced by SVDV and FMDV was performed among the attached cells showing low cytopathic effect. These SVDV-infected cells exhibited fragmented ER cisternae with an expanded lumen, while FMDV-infected cells were characterized by longer and not so swollen cisternae (Fig. 5A). On the other hand, abundant and larger vesicles were identified near the Golgi complex in SVDV-infected cells suggesting that infection altered vesicle traffic through Golgi compartments. In FMDV-infected cells abundant vesicles were also found besides the presence of swollen cisternae (Fig. 5A).

At later stages of SVDV infection, cells with an advanced cytopathic effect showed a completely vacuolated cytoplasm that impaired identification of any vestige of ER or Golgi complex (Fig. 5Ba). Two populations of vesicles could be distinguished. One included vesicles with more than 100 nm in diameter (Fig. 5Ba1) and a second population integrated by smaller vesicles, tightly clustered (Fig. 5Ba2). Double membrane vesicles were identified in the two populations, being more frequently found among the smaller vesicles. In some cases, cells demonstrating advanced cytopathic effect (Fig. 5Bb) exhibited a whole vacuolated cytoplasm, including long dilated cisternae and clustered vesicles. Breaking up cellular nuclei suggests that apoptosis could also take place in these cells (Fig. 5Ba). Thus, electrodense circular inclusions observed in the cytoplasm (Fig. 5Ba and b), would be more likely remnants of cell nuclei than virus containing bodies.

Treatment with BFA differentially affects the infection of IBRS-2 cells by SVDV, FMDV or VSV

BFA, a Golgi disrupting agent, affects picornavirus replication differentially (Gazina et al., 2002; Maynell et al., 1992; Monaghan et al., 2004; O'Donnell et al., 2001; Pietiainen et al., 2004) so we evaluated the effects of BFA on SVDV, FMDV and VSV infection (Fig. 6). As reported for NRK cells (Alcalde et al., 1994), BFA caused on IBRS-2 cells a rapid dispersion of the *cis*-Golgi marker gp74 (Fig. 6A), which indicates Golgi disruption. VSV infection of HeLa cells is very sensitive to Golgi disruption by BFA, since it depends on the function of the

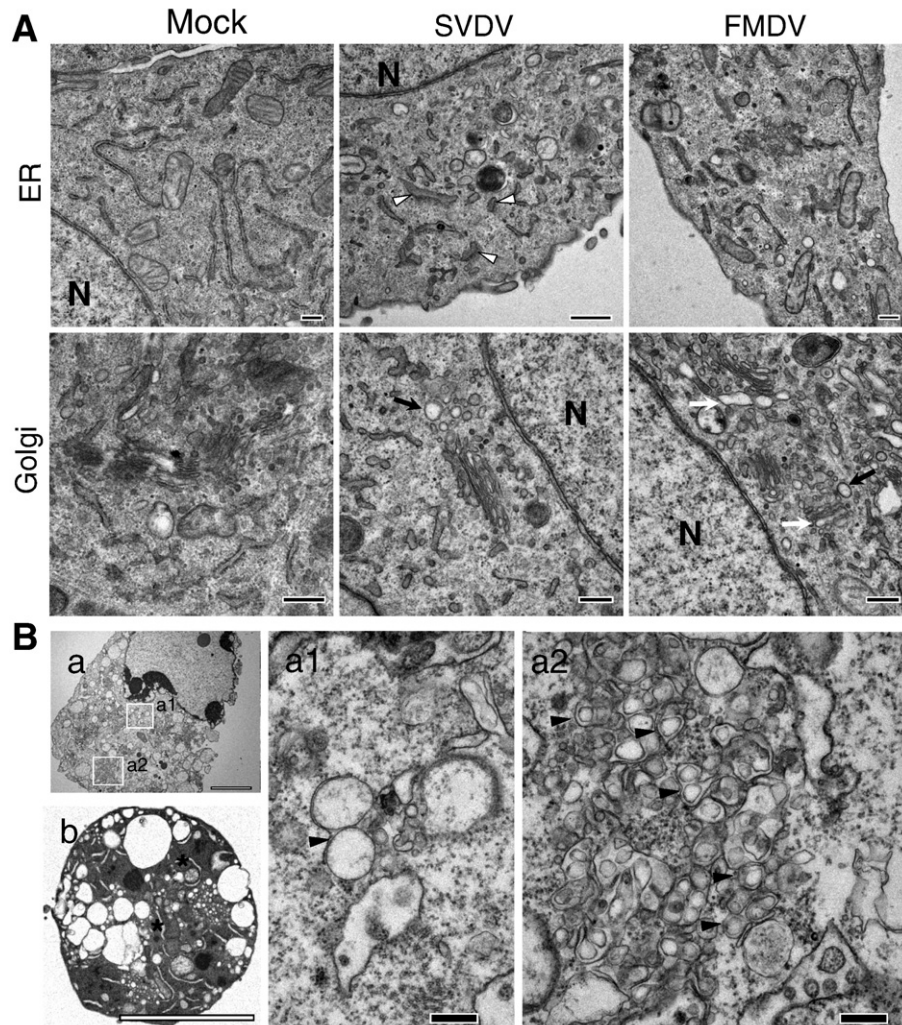


Fig. 5. Ultrastructural alterations in SVDV and FMDV-infected cells. IBRS-2 cells were infected with SVDV (MOI of 40) or FMDV (MOI of 3), fixed after 8 h and 6 h PI, respectively, and the ultrastructure of Golgi and the ER was examined by TEM. The figure shows representative images of: A) Golgi and ER rearrangements in infected cells presenting low cytopathic effect. B) Ultrastructure of SVDV-infected cells presenting two stages of advanced cytopathic effect (a,b). Areas of interest are magnified in a1 and a2. N: cell nucleus; white arrowheads: swollen ER cisternae; black arrows: vesicles near Golgi complex; white arrows: swollen Golgi cisternae; black arrowheads: double membrane vesicles; asterisks: long dilated cisternae; black bars: 100 nm, white bars: 5 μm.

secretory pathway (de Silva et al., 1990; Irurzun et al., 1993; Oda et al., 1990). This was also observed in IBRS-2 cells treated with BFA that showed a decrease in the virus yield (about 4 log) and in the percentage of infected cells (90%) (Fig. 6B). A higher inhibition of the virus yield (about 5 log) was found after SVDV infection and no infected cells could be detected by immunofluorescence staining. Similar reductions of SVDV yield were found when BFA was added from 3 h PI. This confirmed that the inhibition exerted by with this drug, which can also affect virus entry (Pietinen et al., 2004; Sieczkarski and Whittaker, 2002), was mostly affecting post-internalization stages of virus replication (data not shown). Conversely, FMDV infection and virus yield were not inhibited by the BFA treatment of IBRS-2 cells (Fig. 6B), as reported for other FMDV-infected cell lines (Monaghan et al., 2004; O'Donnell et al., 2001). No differences in the VP1 staining pattern between BFA-treated or untreated FMDV-infected cells were noticed (Fig. 6C). In contrast, upon VSV infection fluorescence to G protein

appeared dispersed in BFA-treated cells, reflecting its retention at the ER. The inhibition of SVDV infectivity by BFA correlated with a lack of capsid protein detection by Western blotting. This was not observed in BFA-treated cells following FMDV infection (Fig. 6D).

Thus, BFA affects differentially the yield of infection of the three viruses compared and shows no effect in FMDV-infected IBRS-2 cells.

Discussion

The study of the molecular mechanisms exploited by different viruses to produce similar pathologies in natural hosts is challenging and can provide valuable information to understand virus–host interactions. The intracellular aspects of in vivo pathogenesis are complex since not only the viral receptor/s but also the subsequent interactions between the virus and host cells are relevant for the final outcome of infections (Domingo et al.,

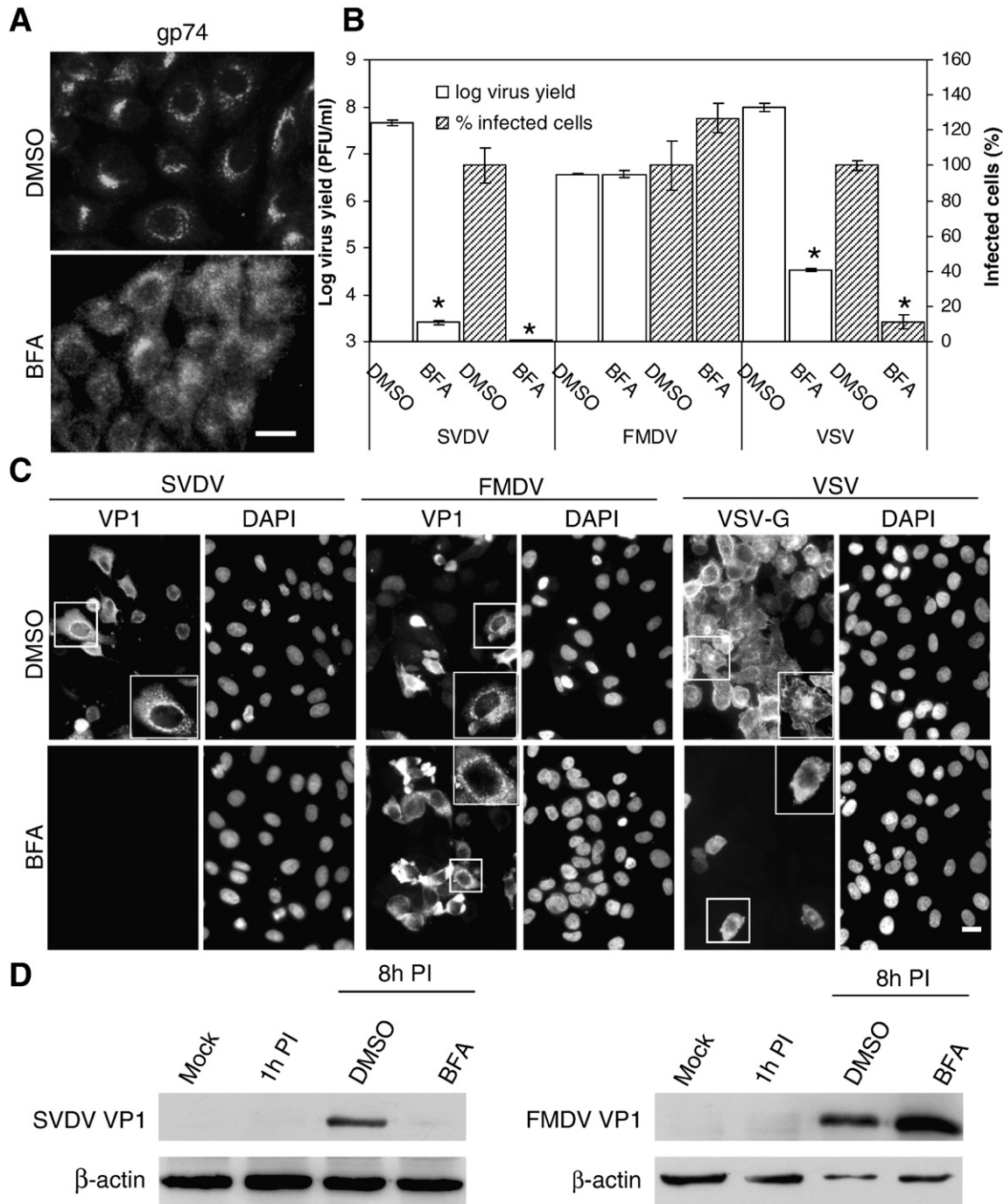


Fig. 6. Effects of Golgi disruption induced by BFA on SVDV, FMDV or VSV infection. A) BFA causes Golgi dispersion. IBRS-2 cells treated for 30 min. with BFA (5 μ g/ml) or DMSO (control cells) were immunostained using MAb 25H8 to the *cis*-Golgi marker gp74. B) Effects of BFA treatment on SVDV, FMDV and VSV infection. BFA-treated and non-treated cells were infected (MOI of 0.5). At 8 h PI, the total virus yield and the percentage of infected cells (relative to untreated cells) were determined by plaque assay and by immunofluorescence using MAbs 2H12 (SVDV VP1), SD6 (FMDV VP1) and I1 (VSV-G), respectively. Asterisks denote statistically significant differences (ANOVA: $p < 0.05$). C) Representative immunofluorescence micrographs corresponding to SVDV, FMDV and VSV-infected cells. Cells were infected and processed for immunofluorescence as described in (B). Infected cells for which enlargements are shown boxed. Bar: 20 μ m. D) Western-blot analysis of SVDV and FMDV production in BFA-treated cells. Infected cells, treated or not with the drug, were lysed at 8 h PI. A lysate from infected control cells (1 h PI) was also included. Western-blotting was performed as described in Materials and methods and membranes were incubated with the rabbit polyclonal antiserum N-ter (SVDV) or with MAb SD6 (FMDV). Membranes incubated with an anti- β -actin antibody were included as a control for protein loading.

2003; Nunez et al., 2007). In this wide scenario, the comparative analysis of specific aspects of virus infection in cultured cells, such as the compartmentalization of virus gene expression and the reorganization of cell structures, is a useful tool. Here, we

have attempted such kind of analyses by using the three viruses causing the main vesicular diseases of domestic animals. The SVDV analyzed in this study is a field isolate that enter cultured cells using the coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR)

and heparan sulfate (Escribano-Romero et al., 2004; Jimenez-Clavero et al., 2005). The FMDV and VSV compared here enter cultured cells using integrins or phosphatidyl serine as receptors, respectively (Baranowski et al., 1998; Jackson et al., 2000; Schlegel et al., 1983). Upon serial passages in cultured cells FMDV can acquire the ability to enter cells via heparan sulfate (Baranowski et al., 1998; Jackson et al., 1996). SVDV, FMDV and VSV similarly infect IBRS-2 cells, a porcine-derived cell line widely used for SVDV and FMDV growth and characterization (Burman et al., 2006; Jimenez-Clavero et al., 2001). The time-course of virus yield was similar between SVDV and FMDV. However, the detection of capsid and NS proteins was delayed for SVDV (Fig. 1). Even when a lower sensitivity in Western-blotting and immunofluorescence of the different SVDV antibodies used cannot be excluded, these results suggest a delayed accumulation of SVDV proteins relative to those observed in FMDV-infected cells.

Fluorescence to antibody N-ter was detected first upon infection. This suggests that an early step in capsid protein synthesis and assembly occur at large, circular structures, interpreted as spherical vesicles, localized close to the nucleus. As infection proceeded, fluorescence to the mature capsids recognized by MAAb 2H12 became predominant and showed lower size and a distribution pattern similar to that observed in FMDV-infected cells (Fig. 2A), while N-ter staining faded. Further experiments are required to understand the capsid modifications mediating these observations. However, these results suggest that immature capsids expose the N-terminus of VP1 and that mature SVDV capsids displaying discontinuous epitopes present in mature virions, mainly accumulate at vesicles with a different average morphology and location than those initially associated to immature capsids.

The colocalization of immature capsids and NS proteins with discrete cumuli of dsRNA suggests that SVDV capsid synthesis and assembly occur associated to the replication complex. This colocalization is also observed between NS proteins and mature capsids, indicating that capsid maturation also associates to the replication complex. These findings are consistent with the coupled viral RNA replication and translation reported to occur for other picornaviruses at the surface of cytoplasmic vesicles originated from membranes derived from ER and Golgi (Egger et al., 2000; Krogerus et al., 2003).

Immunofluorescence studies also showed that SVDV and FMDV disassembled ER and Golgi complexes. Disruption of the ER by FMDV was slightly lower than that induced by SVDV (Figs. 3 and 4). The dispersion of ER and Golgi markers impaired colocalization analyses with SVDV and FMDV proteins (data not shown). Disruption of the Golgi complex has been previously reported for different picornaviruses including FMDV (Cornell et al., 2006; Garcia-Briones et al., 2006; O'Donnell et al., 2001; Sandoval and Carrasco, 1997), and the reorganization of ER by 2B protein has also been observed in enterovirus infected cells (van Kuppeveld et al., 1997). These alterations at ER and Golgi complexes induced by picornaviruses inhibit MHC-I molecules secretion to the cell surface (Deitz et al., 2000; Sanz-Parra et al., 1998), and may contribute to evade host immune response. As expected from

the VSV requirement for an intact secretory pathway (de Silva et al., 1990; Irurzun et al., 1993; Oda et al., 1990), VSV-infected cells did not show alterations of ER and Golgi.

SVDV-infected cells showed by TEM a high proportion of double membrane vesicles and clusters of small membrane-associated vesicles. These structures were not frequently observed in FMDV-infected cells, as described (Monaghan et al., 2004). The differences in the endomembrane reorganizations induced by SVDV and FMDV (Fig. 5) may reflect differential cellular requirements in the organization of the replication complex, such as those reported among different picornaviruses for the cellular components of COP-I coat (Gazina et al., 2002). BFA blocks ADP ribosylation factor 1 (Arf1) by inhibiting specific guanine nucleotide exchange factors (GEFs) involved in recycling of inactive GDP-bound to active GTP-bound forms. Since these factors are required for COP-I retrograde vesicle transport between Golgi and ER complexes, BFA causes Golgi disruption and redistribution of Golgi markers to the ER (Belov et al., 2007; Jackson and Casanova, 2000). BFA inhibited efficiently SVDV infection (one log higher than VSV multiplication) as described for other enteroviruses (Gazina et al., 2002; Maynell et al., 1992). Conversely, BFA did not inhibit FMDV replication, as reported for BHK cells infected with type O and A FMDVs (Monaghan et al., 2004; O'Donnell et al., 2001).

In PV, 3A and 3CD have been shown to mediate translocation of specific Arfs and their GEFs – GBF1 and BIG1/2, respectively –, which are susceptible for BFA inhibition (Belov et al., 2007, 2005; Niu et al., 2005). In addition, BFA-resistant PV mutants carried mutations in 2C and 3A proteins (Crotty et al., 2004), which also indicates a possible role for 2C protein in membrane recruiting. The sensitivity to BFA observed for SVDV infection (Fig. 6) suggests a role for BFA-susceptible GEFs in the membrane recruiting induced by this virus. On the other hand, 3A protein from CVB3, a close relative to SVDV, can interact with GBF1 blocking Arf-1 mediated COP-I assembly and causing protein transport blockage (Wessels et al., 2006b). This is also observed for PV but not for FMDV 3A proteins (Wessels et al., 2006a). Thus, the differential effect of BFA on SVDV or FMDV replication suggests differences in the capacity of their 3A proteins to interact with GEFs.

Autophagy and COP-II dependent transport, which are not inhibited by BFA (Belov et al., 2005), have been also implicated in the intracellular vesicle formation induced by PV and other picornaviruses (Jackson et al., 2005; Rust et al., 2001; Schlegel et al., 1996; Suhy et al., 2000). The double membrane structures observed in Fig. 5 might indicate an autophagy origin of part of the vesicles induced in SVDV-infected cells. The contribution of autophagy and COP-II dependent transport to FMDV membrane recruitment remains to be clarified.

Overall, the results reported here suggest that despite being able to infect similar epithelia and to produce undistinguishable lesions in natural hosts (Alexandersen and Mowat, 2005; Cornish et al., 2001; Mulder et al., 1997), SVDV and FMDV utilize different mechanisms to build their replication complex, and that these mechanisms share little in common to that used by the rhabdovirus VSV.

Materials and methods

Cells and viruses

The two cell lines employed in this study were IBRS-2 (De Castro, 1964) derived from swine kidney, and BHK-21 derived from Syrian golden hamster kidney (Macpherson and Stoker, 1962). Both cell lines were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco-BRL) supplemented with 5% fetal calf serum (FCS) (Sigma), L-glutamine (2 mM), penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 µg/ml). The SVDV isolate SPA/1/93 (Jimenez-Clavero et al., 1998) was propagated on IBRS-2 cells. Viral stocks from type C FMDV C-S8c1 (Sobrinho et al., 1983) and VSV Indiana serotype isolates were produced by amplification in BHK-21 cells.

Antibodies and reagents

SVDV mature capsids were visualized using MAb 2H12 and 5C4 (Borrego et al., 2002). A rabbit polyclonal antiserum to a synthetic peptide spanning the 20 N-terminal residues of VP1 (Jimenez-Clavero et al., 2001) was used to detect this protein in Western-blotting assays or when incorporated as part of immature capsids (fluorescence assays). FMDV VP1 was detected by MAb SD6, which recognizes a continuous epitope exposed in viral capsids (Mateu et al., 1987), or by a rabbit polyclonal antiserum (Strebel et al., 1986). VSV-G glycoprotein was detected using mouse MAb II (Lefrancois and Lyles, 1982). Rabbit polyclonal antisera against coxsackievirus B3 (CVB3) NS proteins 2BC, 3A (Cornell et al., 2006) and 2C (Whitton et al., unpublished results) were employed for SVDV NS protein detection. *cis* and *trans*-Golgi networks were stained using MAb 25H8 to gp74 (Alcalde et al., 1994) or a polyclonal rabbit antiserum to caveolin-1 (BD Transduction Laboratories), respectively. Calreticulin rabbit polyclonal antiserum (Abcam) and MAb 1D3 against protein disulfide isomerase (PDI) (Stressgene) were used for ER staining, and MAb AC-15 (Sigma) was employed to detect β -actin. MAb J2 (English & Scientific Consulting) was employed to detect double-stranded RNA (dsRNA). Alexa Fluor 488 (green) and 594 or 555 (red) conjugated anti-mouse or anti-rabbit secondary antibodies (Invitrogen) were used to recognize primary antibodies in immunofluorescence assays. For Western-blotting, anti-rabbit or anti-mouse horseradish peroxidase (HRP)-coupled secondary antibodies (GE Healthcare) were utilized. A stock solution (20 mg/ml) of BFA (Sigma) was prepared in DMSO.

Infections and virus titrations

Cells were washed twice with DMEM and infected with different multiplicities of infection expressed as PFU/cell (hence MOI). After 1 h adsorption, inoculum was removed and fresh medium containing 5% FCS was added. This time-point was considered 1 h post-infection (PI). For BFA treatment, the drug was added to cultures 30 min before infection, and it was maintained during the whole infection time to avoid cellular recuperation. The virus released in infection medium and the

total virus produced (intracellular and medium-released, recovered by three freeze–thaw cycles) were quantified as PFU/ml by plaque assay (Sobrinho et al., 1983). FMDV and VSV titers were obtained in BHK-21 (at 24 h PI), while SVDV titers were determined in IBRS-2 cells (at 48 h PI).

Immunofluorescence and confocal microscopy

Infected cells, grown on coverslips, were fixed with 4% paraformaldehyde or in cold absolute methanol for *cis*-Golgi staining, and processed for immunofluorescence assays as reported (Garcia-Briones et al., 2006). Nuclei were counterstained with 1 µg/ml DAPI (Molecular Probes) or with To-Pro-3 (Molecular Probes) and samples were examined using an Olympus BX61 epifluorescence microscope coupled to a digital cooled charge-coupled-device (CCD) camera DP70 (Olympus). Images were acquired using Olympus DP controller software. For confocal laser scanning microscopy, images were collected using an Axiovert S100 TV microscope (Zeiss) equipped with a confocal Radiance 2000 system (Bio-Rad) and acquired using Lasersharp2000 5.2 software (Bio-Rad). Sequential scanning for different laser lines was performed to avoid false colocalization and images were processed using Adobe Photoshop 7.0.1 (Adobe Systems Inc.).

Transmission electron microscopy (TEM)

Mock or infected cell monolayers, grown on 100 mm Ø dishes, were washed 3 times with PBS and fixed 30 min at 37 °C in 4% paraformaldehyde–2% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer pH 7.4 supplemented with 5 mM CaCl₂. Cells were scrapped and postfixed in 1% osmium tetroxide–1% potassium ferricyanide for 1 h at 4 °C, washed three times with bidistilled water and treated with 0.15% tannic acid in phosphate buffer pH 7.4 for 1 min. Cells were washed with the buffer and with bidistilled water prior to the staining with 2% uranyl acetate for 1 h at RT. After three washes with bidistilled water samples were dehydrated in ethanol and embedded in TAAB 812 resin (TAAB laboratories, Berkshire, UK). Samples were examined using a Jeol JEM-1010 electron microscope (Jeol, Japan) operating at 80 kV and images were acquired using a digital camera Bioscan792 (Gatan, Inc. 5933 Coronado Lane, Pleasanton, CA 94588).

Western-blot assay

Infected cells, grown on 35 mm Ø dishes, were lysed and their proteins resolved on SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane, as described (Garcia-Briones et al., 2006). Membranes were blocked with 3% skimmed milk in PBS, washed with PBS–0.5% Tween and incubated over night at 4 °C with the primary antibody diluted in PBS–1% BSA. After washing with PBS–0.5% Tween, membranes were incubated with appropriated secondary antibody coupled to HRP in PBS–1% BSA for 1 h at RT, and washed with PBS–0.5% Tween. Proteins were detected by using Western Lighting Chemiluminescence Reagent (Perkin Elmer).

Data analysis

Analysis of the variance (ANOVA), using *F* Fischer–Snedecor distribution, was performed with statistical package SPSS 13.0 (SPSS Inc.) for Windows.

Acknowledgments

We wish to thank L. Whitton for offering us the use of sera to non-structural CVB3 proteins. We also thank V. Ley and M.A. Jiménez-Clavero for providing us with SVDV isolate SPA/1/93 and with serum to SVDV VP1, M. Dávila and E. Domingo for VSV Indiana isolate and MAb I1, I. Sandoval for MAb 25H8, E. Beck for FMDV VP1 antiserum, and M. López for her excellent technical assistance. This work was supported by Spanish grants from CICYT (BIO2005-07592-C02-01), MEC (CSD2006-0007) and by Fundación Severo Ochoa.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bone.2007.08.047.

References

- Alcalde, J., Egea, G., Sandoval, I.V., 1994. gp74 a membrane glycoprotein of the cis-Golgi network that cycles through the endoplasmic reticulum and intermediate compartment. *J. Cell Biol.* 124 (5), 649–665.
- Alexandersen, S., Mowat, N., 2005. Foot-and-mouth disease: host range and pathogenesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 288, 9–42.
- Arnheiter, H., Dubois-Dalcq, M., Lazzarini, R.A., 1984. Direct visualization of protein transport and processing in the living cell by microinjection of specific antibodies. *Cell* 39 (1), 99–109.
- Baranowski, E., Sevilla, N., Verdager, N., Ruiz-Jarabo, C.M., Beck, E., Domingo, E., 1998. Multiple virulence determinants of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *J. Virol.* 72 (8), 6362–6372.
- Belov, G.A., Altan-Bonnet, N., Kovtunovich, G., Jackson, C.L., Lippincott-Schwartz, J., Ehrenfeld, E., 2007. Hijacking components of the cellular secretory pathway for replication of poliovirus RNA. *J. Virol.* 81 (2), 558–567.
- Belov, G.A., Fogg, M.H., Ehrenfeld, E., 2005. Poliovirus proteins induce membrane association of GTPase ADP-ribosylation factor. *J. Virol.* 79 (11), 7207–7216.
- Belsham, G.J., Martínez-Salas, E., 2004. Genome organization, translation and replication of foot-and-mouth disease virus. In: Sobrino, F., Domingo, E. (Eds.), “Foot-and-Mouth Disease. Current Perspectives.”. Horizon Bioscience, Norfolk, UK.
- Bienz, K., Egger, D., Pasamontes, L., 1987. Association of polioviral proteins of the P2 genomic region with the viral replication complex and virus-induced membrane synthesis as visualized by electron microscopic immunocytochemistry and autoradiography. *Virology* 160 (1), 220–226.
- Borrego, B., Carra, E., Garcia-Ranea, J.A., Brocchi, E., 2002. Characterization of neutralization sites on the circulating variant of swine vesicular disease virus (SVDV): a new site is shared by SVDV and the related coxsackie B5 virus. *J. Gen. Virol.* 83 (Pt 1), 35–44.
- Brocchi, E., Zhang, G., Knowles, N.J., Wilsden, G., McCauley, J.W., Marquardt, O., Ohlinger, V.F., De Simone, F., 1997. Molecular epidemiology of recent outbreaks of swine vesicular disease: two genetically and antigenically distinct variants in Europe, 1987–94. *Epidemiol. Infect.* 118 (1), 51–61.
- Buenz, E.J., Howe, C.L., 2006. Picornaviruses and cell death. *Trends Microbiol.* 14 (1), 28–36.
- Burman, A., Clark, S., Abrescia, N.G., Fry, E.E., Stuart, D.I., Jackson, T., 2006. Specificity of the VP1 GH loop of foot-and-mouth disease virus for {alpha} v integrins. *J. Virol.* 80 (19), 9798–9810.
- Cornell, C.T., Kiesses, W.B., Harkins, S., Whitton, J.L., 2006. Inhibition of protein trafficking by coxsackievirus b3: multiple viral proteins target a single organelle. *J. Virol.* 80 (13), 6637–6647.
- Cornish, T.E., Stallknecht, D.E., Brown, C.C., Seal, B.S., Howerth, E.W., 2001. Pathogenesis of experimental vesicular stomatitis virus (New Jersey serotype) infection in the deer mouse (*Peromyscus maniculatus*). *Vet. Pathol.* 38 (4), 396–406.
- Crotty, S., Saleh, M.C., Gitlin, L., Beske, O., Andino, R., 2004. The poliovirus replication machinery can escape inhibition by an antiviral drug that targets a host cell protein. *J. Virol.* 78 (7), 3378–3386.
- De Castro, M.P., 1964. Behaviour of the foot-and-mouth disease virus in cell cultures: susceptibility of the IB-RS-2 cell line. *Arq. Inst. Biol. Sao Paulo* 31, 63–78.
- de Silva, A.M., Balch, W.E., Helenius, A., 1990. Quality control in the endoplasmic reticulum: folding and misfolding of vesicular stomatitis virus G protein in cells and in vitro. *J. Cell Biol.* 111 (3), 857–866.
- Deitz, S.B., Dodd, D.A., Cooper, S., Parham, P., Kirkegaard, K., 2000. MHC I-dependent antigen presentation is inhibited by poliovirus protein 3A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (25), 13790–13795.
- Doedens, J.R., Kirkegaard, K., 1995. Inhibition of cellular protein secretion by poliovirus proteins 2B and 3A. *Embo J.* 14 (5), 894–907.
- Domingo, E., Escarmis, C., Baranowski, E., Ruiz-Jarabo, C.M., Carrillo, E., Nunez, J.I., Sobrino, F., 2003. Evolution of foot-and-mouth disease virus. *Virus Res.* 91 (1), 47–63.
- Echeverri, A.C., Dasgupta, A., 1995. Amino terminal regions of poliovirus 2C protein mediate membrane binding. *Virology* 208 (2), 540–553.
- Egger, D., Teterina, N., Ehrenfeld, E., Bienz, K., 2000. Formation of the poliovirus replication complex requires coupled viral translation, vesicle production, and viral RNA synthesis. *J. Virol.* 74 (14), 6570–6580.
- Ehrenfeld, E., 1982. Poliovirus-induced inhibition of host-cell protein synthesis. *Cell* 28 (3), 435–436.
- Escribano-Romero, E., Jimenez-Clavero, M.A., Gomes, P., Garcia-Ranea, J.A., Ley, V., 2004. Heparan sulphate mediates swine vesicular disease virus attachment to the host cell. *J. Gen. Virol.* 85 (Pt 3), 653–663.
- Escribano-Romero, E., Jimenez-Clavero, M.A., Ley, V., 2000. Swine vesicular disease virus. Pathology of the disease and molecular characteristics of the virion. *Anim. Health Res. Rev.* 1 (2), 119–126.
- Forss, S., Strebel, K., Beck, E., Schaller, H., 1984. Nucleotide sequence and genome organization of foot-and-mouth disease virus. *Nucleic Acids Res.* 12 (16), 6587–6601.
- Garcia-Briones, M., Rosas, M.F., Gonzalez-Magaldi, M., Martín-Acebes, M.A., Sobrino, F., Armas-Portela, R., 2006. Differential distribution of non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus in BHK-21 cells. *Virology* 349 (2), 409–421.
- Gazina, E.V., Mackenzie, J.M., Gorrell, R.J., Anderson, D.A., 2002. Differential requirements for COPI coats in formation of replication complexes among three genera of *Picornaviridae*. *J. Virol.* 76 (21), 11113–11122.
- Holland, J.J., 1962. Inhibition of DNA-primed RNA synthesis during poliovirus infection of human cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 9, 556–562.
- Irurzun, A., Perez, L., Carrasco, L., 1993. Brefeldin A blocks protein glycosylation and RNA replication of vesicular stomatitis virus. *FEBS Lett.* 336 (3), 496–500.
- Jackson, C.L., Casanova, J.E., 2000. Turning on ARF: the Sec7 family of guanine-nucleotide-exchange factors. *Trends Cell Biol.* 10 (2), 60–67.
- Jackson, W.T., Giddings Jr., T.H., Taylor, M.P., Mulinyawe, S., Rabinovitch, M., Kopito, R.R., Kirkegaard, K., 2005. Subversion of cellular autophagosomal machinery by RNA viruses. *PLoS Biol.* 3 (5), e156.
- Jackson, T., Sheppard, D., Denyer, M., Blakemore, W., King, A.M., 2000. The epithelial integrin alphavbeta6 is a receptor for foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* 74 (11), 4949–4956.
- Jackson, T., Ellard, F.M., Ghazaleh, R.A., Brookes, S.M., Blakemore, W.E., Corteyn, A.H., Stuart, D.I., Newman, J.W., King, A.M., 1996. Efficient infection of cells in culture by type O foot-and-mouth disease virus requires binding to cell surface heparan sulfate. *J. Virol.* 70 (8), 5282–5287.
- Jimenez-Clavero, M.A., Escribano-Romero, E., Ley, V., Spiller, O.B., 2005. More recent swine vesicular disease virus isolates retain binding to coxsackie-adenovirus receptor, but have lost the ability to bind human decay-accelerating factor (CD55). *J. Gen. Virol.* 86 (Pt 5), 1369–1377.

- Jimenez-Clavero, M.A., Escribano-Romero, E., Douglas, A.J., Ley, V., 2001. The N-terminal region of the VP1 protein of swine vesicular disease virus contains a neutralization site that arises upon cell attachment and is involved in viral entry. *J. Virol.* 75 (2), 1044–1047.
- Jimenez-Clavero, M.A., Escribano-Romero, E., Sanchez-Vizcaino, J.M., Ley, V., 1998. Molecular cloning, expression and immunological analysis of the capsid precursor polypeptide (P1) from swine vesicular disease virus. *Virus Res.* 57 (2), 163–170.
- Knowles, N.J., Wilsden, G., Reid, S.M., Ferris, N.P., King, D.P., Paton, D.J., Ferevereiro, M., Brocchi, E., 2007. Reappearance of swine vesicular disease virus in Portugal. *Vet. Rec.* 161 (2), 71.
- Knox, C., Moffat, K., Ali, S., Ryan, M., Wileman, T., 2005. Foot-and-mouth disease virus replication sites form next to the nucleus and close to the Golgi apparatus, but exclude marker proteins associated with host membrane compartments. *J. Gen. Virol.* 86 (Pt 3), 687–696.
- Krogerus, C., Egger, D., Samuilova, O., Hyypia, T., Bienz, K., 2003. Replication complex of human parechovirus 1. *J. Virol.* 77 (15), 8512–8523.
- Kurzchalia, T.V., Dupree, P., Monier, S., 1994. VIP21-Caveolin, a protein of the trans-Golgi network and caveolae. *FEBS Lett.* 346 (1), 88–91.
- Lefrancois, L., Lyles, D.S., 1982. The interaction of antibody with the major surface glycoprotein of vesicular stomatitis virus. II. Monoclonal antibodies of nonneutralizing and cross-reactive epitopes of Indiana and New Jersey serotypes. *Virology* 121 (1), 168–174.
- Letchworth, G.J., Rodriguez, L.L., Del Cbarrera, J., 1999. Vesicular stomatitis. *Vet. J.* 157 (3), 239–260.
- Lin, F., Kitching, R.P., 2000. Swine vesicular disease: an overview. *Vet. J.* 160 (3), 192–201.
- Macpherson, I., Stoker, M., 1962. Polyoma transformation of hamster cell clones—an investigation of genetic factors affecting cell competence. *Virology* 16, 147–151.
- Mateu, M.G., Rocha, E., Vicente, O., Vayreda, F., Navalpotro, C., Andreu, D., Pedrosa, E., Giralt, E., Enjuanes, L., Domingo, E., 1987. Reactivity with monoclonal antibodies of viruses from an episode of foot-and-mouth disease. *Virus Res.* 8 (3), 261–274.
- Maynell, L.A., Kirkegaard, K., Klymkowsky, M.W., 1992. Inhibition of poliovirus RNA synthesis by brefeldin A. *J. Virol.* 66 (4), 1985–1994.
- Moffat, K., Howell, G., Knox, C., Belsham, G.J., Monaghan, P., Ryan, M.D., Wileman, T., 2005. Effects of foot-and-mouth disease virus nonstructural proteins on the structure and function of the early secretory pathway: 2BC but not 3A blocks endoplasmic reticulum-to-Golgi transport. *J. Virol.* 79 (7), 4382–4395.
- Monaghan, P., Cook, H., Jackson, T., Ryan, M., Wileman, T., 2004. The ultrastructure of the developing replication site in foot-and-mouth disease virus-infected BHK-38 cells. *J. Gen. Virol.* 85 (Pt 4), 933–946.
- Mulder, W.A., van Poelwijk, F., Moormann, R.J., Reus, B., Kok, G.L., Pol, J.M., Dekker, A., 1997. Detection of early infection of swine vesicular disease virus in porcine cells and skin sections. A comparison of immunohistochemistry and in-situ hybridization. *J. Virol. Methods* 68 (2), 169–175.
- Nardelli, L., Lodetti, E., Gualandi, G.L., Burrows, R., Goodridge, D., Brown, F., Cartwright, B., 1968. A foot and mouth disease syndrome in pigs caused by an enterovirus. *Nature* 219 (5160), 1275–1276.
- Niu, T.K., Pfeifer, A.C., Lippincott-Schwartz, J., Jackson, C.L., 2005. Dynamics of GBF1, a brefeldin A-sensitive Arf1 exchange factor at the Golgi. *Mol. Biol. Cell* 16 (3), 1213–1222.
- Nunez, J.I., Molina, N., Baranowski, E., Domingo, E., Clark, S., Burman, A., Berryman, S., Jackson, T., Sobrino, F., 2007. Guinea pig-adapted foot-and-mouth disease virus with altered receptor recognition can productively infect a natural host. *J. Virol.* 81 (16), 8497–8506.
- O'Donnell, V.K., Pacheco, J.M., Henry, T.M., Mason, P.W., 2001. Subcellular distribution of the foot-and-mouth disease virus 3A protein in cells infected with viruses encoding wild-type and bovine-attenuated forms of 3A. *Virology* 287 (1), 151–162.
- Oda, K., Fujiwara, T., Ikehara, Y., 1990. Brefeldin A arrests the intracellular transport of viral envelope proteins in primary cultured rat hepatocytes and HepG2 cells. *Biochem. J.* 265 (1), 161–167.
- Odenwald, W.F., Arnheiter, H., Dubois-Dalq, M., Lazzarini, R.A., 1986. Stereo images of vesicular stomatitis virus assembly. *J. Virol.* 57 (3), 922–932.
- Pietiaainen, V., Marjomaki, V., Upla, P., Pelkmans, L., Helenius, A., Hyypia, T., 2004. Echovirus 1 endocytosis into caveosomes requires lipid rafts, dynamin II, and signaling events. *Mol. Biol. Cell* 15 (11), 4911–4925.
- Rowlands, D.J., 2003. Foot-and-mouth disease. Special issue *Virus Res.* 91 (1).
- Rust, R.C., Landmann, L., Gosert, R., Tang, B.L., Hong, W., Hauri, H.P., Egger, D., Bienz, K., 2001. Cellular COPII proteins are involved in production of the vesicles that form the poliovirus replication complex. *J. Virol.* 75 (20), 9808–9818.
- Sandoval, I.V., Carrasco, L., 1997. Poliovirus infection and expression of the poliovirus protein 2B provoke the disassembly of the Golgi complex, the organelle target for the antipoliovirus drug Ro-090179. *J. Virol.* 71 (6), 4679–4693.
- Sanz-Parra, A., Sobrino, F., Ley, V., 1998. Infection with foot-and-mouth disease virus results in a rapid reduction of MHC class I surface expression. *J. Gen. Virol.* 79 (Pt 3), 433–436.
- Schlegel, A., Giddings Jr., T.H., Ladinsky, M.S., Kirkegaard, K., 1996. Cellular origin and ultrastructure of membranes induced during poliovirus infection. *J. Virol.* 70 (10), 6576–6588.
- Schlegel, R., Tralka, T.S., Willingham, M.C., Pastan, I., 1983. Inhibition of VSV binding and infectivity by phosphatidylserine: is phosphatidylserine a VSV-binding site? *Cell* 32 (2), 639–646.
- Shepherd, C.M., Borelli, I.A., Lander, G., Natarajan, P., Siddavanahalli, V., Bajaj, C., Johnson, J.E., Brooks III, C.L., Reddy, V.S., 2006. VIPERdb: a relational database for structural virology. *Nucleic Acids Res.* 34, D386–D389 (Database issue).
- Sieczkarski, S.B., Whittaker, G.R., 2002. Dissecting virus entry via endocytosis. *J. Gen. Virol.* 83 (Pt 7), 1535–1545.
- Sobrino, F., Domingo, E. (Eds.), 2004. Foot-and-Mouth Disease. Current Perspectives. Horizon Bioscience, Norfolk, UK.
- Sobrino, F., Davila, M., Ortin, J., Domingo, E., 1983. Multiple genetic variants arise in the course of replication of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *Virology* 128 (2), 310–318.
- Strebel, K., Beck, E., Strohmaier, K., Schaller, H., 1986. Characterization of foot-and-mouth disease virus gene products with antisera against bacterially synthesized fusion proteins. *J. Virol.* 57 (3), 983–991.
- Suhy, D.A., Giddings Jr., T.H., Kirkegaard, K., 2000. Remodeling the endoplasmic reticulum by poliovirus infection and by individual viral proteins: an autophagy-like origin for virus-induced vesicles. *J. Virol.* 74 (19), 8953–8965.
- Towner, J.S., Ho, T.V., Semler, B.L., 1996. Determinants of membrane association for poliovirus protein 3AB. *J. Biol. Chem.* 271 (43), 26810–26818.
- van Kuppeveld, F.J., Hoenderop, J.G., Smeets, R.L., Willems, P.H., Dijkman, H.B., Galama, J.M., Melchers, W.J., 1997. Coxsackievirus protein 2B modifies endoplasmic reticulum membrane and plasma membrane permeability and facilitates virus release. *Embo J.* 16 (12), 3519–3532.
- van Kuppeveld, F.J., Galama, J.M., Zoll, J., van den Hurk, P.J., Melchers, W.J., 1996. Coxsackie B3 virus protein 2B contains cationic amphipathic helix that is required for viral RNA replication. *J. Virol.* 70 (6), 3876–3886.
- Verdaguer, N., Jimenez-Clavero, M.A., Fita, I., Ley, V., 2003. Structure of swine vesicular disease virus: mapping of changes occurring during adaptation of human coxsackie B5 virus to infect swine. *J. Virol.* 77 (18), 9780–9789.
- Wessels, E., Duijsings, D., Lanke, K.H., van Dooren, S.H., Jackson, C.L., Melchers, W.J., van Kuppeveld, F.J., 2006a. Effects of picornavirus 3A proteins on protein transport and GBF1-dependent COP-I recruitment. *J. Virol.* 80 (23), 11852–11860.
- Wessels, E., Duijsings, D., Niu, T.K., Neumann, S., Oorschot, V.M., de Lange, F., Lanke, K.H., Klumperman, J., Henke, A., Jackson, C.L., Melchers, W.J., van Kuppeveld, F.J., 2006b. A viral protein that blocks Arf1-mediated COP-I assembly by inhibiting the guanine nucleotide exchange factor GBF1. *Dev. Cell* 11 (2), 191–201.
- Wessels, E., Notebaart, R.A., Duijsings, D., Lanke, K., Vergeer, B., Melchers, W.J., van Kuppeveld, F.J., 2006c. Structure–function analysis of the coxsackievirus protein 3A: identification of residues important for dimerization, viral RNA replication, and transport inhibition. *J. Biol. Chem.* 281 (38), 28232–28243.
- Whitton, J.L., Cornell, C.T., Feuer, R., 2005. Host and virus determinants of picornavirus pathogenesis and tropism. *Nat. Rev. Microbiol.* 3 (10), 765–776.
- Zhang, G., Haydon, D.T., Knowles, N.J., McCauley, J.W., 1999. Molecular evolution of swine vesicular disease virus. *J. Gen. Virol.* 80 (Pt 3), 639–651.
- Zhang, G., Wilsden, G., Knowles, N.J., McCauley, J.W., 1993. Complete nucleotide sequence of a coxsackie B5 virus and its relationship to swine vesicular disease virus. *J. Gen. Virol.* 74 (Pt 5), 845–853.



Susceptibility to viral infection is enhanced by stable expression of 3A or 3AB proteins from foot-and-mouth disease virus[☆]

María F. Rosas^a, Yuri A. Vieira^a, Raúl Postigo^a, Miguel A. Martín-Acebes^a, Rosario Armas-Portela^{a,b,1}, Encarnación Martínez-Salas^a, Francisco Sobrino^{a,c,*}

^a Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" (CSIC-UAM), Madrid, Spain

^b Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, Madrid, Spain

^c Centro de Investigación en Sanidad Animal, INIA, Valdeolmos, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 April 2008

Returned to author for revision 5 May 2008

Accepted 28 June 2008

Available online 9 August 2008

Keywords:

FMDV non-structural proteins

Stable and transient expression

Effect on cells

Virus growth modulation

ABSTRACT

The foot-and-mouth disease virus (FMDV) 3A protein is involved in virulence and host range. A distinguishing feature of FMDV 3B among picornaviruses is that three non-identical copies are encoded in the viral RNA and required for optimal replication in cell culture. Here, we have studied the involvement of the 3AB region on viral infection using constitutive and transient expression systems. BHK-21 stably transformed clones expressed low levels of FMDV 3A or 3A(B) proteins in the cell cytoplasm. Transformed cells stably expressing these proteins did not exhibit inner cellular rearrangements detectable by electron microscope analysis. Upon FMDV infection, clones expressing either 3A alone or 3A(B) proteins showed a significant increase in the percentage of infected cells, the number of plaque forming units and the virus yield. The 3A-enhancing effect was specific for FMDV as no increase in viral multiplication was observed in transformed clones infected with another picornavirus, encephalomyocarditis virus, or the negative-strand RNA virus vesicular stomatitis virus. A potential role of 3A protein in viral RNA translation was discarded by the lack of effect on FMDV IRES-dependent translation. Increased viral susceptibility was not caused by a released factor; neither the supernatant of transformed clones nor the addition of purified 3A protein to the infection medium was responsible for this effect. Unlike stable expression, high levels of 3A or 3A(B) protein transient expression led to unspecific inhibition of viral infection. Therefore, the effect observed on viral yield, which inversely correlated with the intracellular levels of 3A protein, suggests a transacting role operating on the FMDV multiplication cycle.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Foot-and-mouth disease virus (FMDV) is the prototypic member of the aphthovirus genus within the family Picornaviridae (Bachrach, 1977; Domingo et al., 1990; Pereira, 1981; Sobrino et al., 2001) and the etiological agent of a devastating disease of livestock (Knowles et al., 2001). The viral particle is composed by a protein capsid that contains a positive-sense RNA molecule of about 8500 nucleotides that is infectious and encodes a single polyprotein, processed in infected cells to yield different polypeptide precursors and the mature viral proteins (Belsham, 2005; Sobrino et al., 2001). Polyprotein processing is carried out by *cis* and *trans*-acting viral proteases rendering the mature structural and nonstructural (NS) proteins (Ryan and Drew, 1994). The proteins encoded within the P1 region (VP1–4) form the capsid, while

L protein and those encoded in the P2 (2B,2C) and P3 (3A, 3B, 3C and 3D) regions are NS proteins (Belsham and Martínez-Salas, 2004).

Picornavirus NS proteins, and some of their precursors, are involved in crucial aspects of viral cycle, such as RNA replication, rearrangements of intracellular membranes required for this process, pathogenesis and lysis of host cells (Andino et al., 1999; Bienz et al., 1983; Buenz and Howe, 2006; Cho et al., 1994; Choe et al. 2005; Whitton et al., 2005). Protein 3A is an example of this multifunctional role. In poliovirus (PV), the interaction between the RNA replication complex and intracellular membranes appears to be accomplished by proteins 3A and 2C, which have membrane-binding properties (Bienz et al., 1987; Semler et al., 1982). When expressed independently PV 3A co-fractionates with ER markers (Suhy et al., 2000) and its single transient expression can disrupt the secretory apparatus (Choe et al., 2005; Deitz et al., 2000; Doedens et al., 1997). On the other hand, 3AB presumably anchors 3B in the novo intracellular membranes originated during the initiation of RNA replication, where uridylylated 3B primes the synthesis of nascent viral RNAs (Andino et al., 1993; Lama et al., 1994; Lyle et al., 2002; Takegami et al., 1983; Towner et al., 1996). PV 3AB has a non-specific RNA-binding activity and associates

[☆] Dedicated to the memory of Rosario Armas-Portela.

* Corresponding author. Mailing address: CBMSO, Cantoblanco 28049, Madrid, Spain. Fax: +34 91 1964420.

E-mail address: fsobrino@cbm.uam.es (F. Sobrino).

¹ Deceased.

with the cloverleaf structure in the 5' end of viral RNA and with the 3CD precursor to form a ribonucleoprotein complex required for PV RNA synthesis (Hope et al., 1997; Lama et al., 1994; Xiang et al., 1998; Xiang et al., 1995). Additionally, 3AB has been reported as a co-factor for 3Dpol activity (Lama et al., 1995).

The organization of the FMDV 3AB region is unique among the picornaviruses. Protein 3A extends its carboxy-terminus in at least 60 amino acids, a feature recently reported for bovine rhinovirus type 2 (Hollister et al., 2008). Also, three non-identical copies of 3B (3AB₁B₂B₃) are encoded and expressed in susceptible cells (Falk et al., 1992; Forss et al., 1984; Garcia-Briones et al., 2006; O'Donnell et al., 2001). Each of the 3B proteins can be *in vitro* uridylylated by 3Dpol (Ferrer-Orta et al., 2006; Nayak et al., 2005) and deletions of redundant copies led to a decrease in FMDV replication efficiency in cell culture (Falk et al., 1992) and attenuation in pigs (Pacheco et al., 2003). Engineered FMDV RNA with truncated 3A versions showed a decreased infectivity in bovine, but not in BHK-21 or porcine cells (Pacheco et al., 2003). Mutations in 3A, found in field isolates, are associated to FMDV hypervirulence in pigs and attenuation in cattle (Beard and Mason, 2000), and a single amino acid substitution in this protein can mediate adaptation of the virus to guinea-pigs (Nunez et al., 2001).

In comparison to other picornaviruses, differences in FMDV-induced membrane rearrangements in infected cells have been reported. FMDV infection is resistant to brefeldin A treatment (O'Donnell et al., 2001), a drug that disrupts the Golgi complex and inhibits replication of other picornaviruses, such as PV (Irruzun et al., 1992). In PV and coxsackievirus, 3A, but not 3AB, mediates the inhibition of the anterograde traffic between the ER and the Golgi (Doedens et al., 1997), resulting in a reduced secretion of proteins such as MHC class I molecules (Choe et al., 2005) and TNF receptor (Neznanov et al., 2001). In FMDV, transient expression of 2BC, but not of 3A, has been reported to inhibit host protein secretion in Vero cells (Moffat et al., 2005).

FMDV 3A protein is predicted to contain a hydrophobic domain (Forss et al., 1984) and is found associated to crude membrane extracts from infected cells (Moffat et al., 2005). Fluorescence to 3A in infected cells partially co-localizes with the ER marker calreticulin and with the Golgi stacks protein p58 (Garcia-Briones et al., 2006; O'Donnell et al., 2001). Unlike what is observed in other picornaviruses, transient expression of 3AB proteins does not induce major rearrangements of intracellular membranes as inferred from immunofluorescence and electron microscopy (EM) studies (Garcia-Briones et al., 2006; O'Donnell et al., 2001). When transiently expressed, FMDV 3A preferentially localized at small vesicles (Moffat et al., 2005; O'Donnell et al., 2001). Interestingly, sequential addition of protein 3B copies resulted in a relocation of the 3AB products – hence 3A(B) – that became progressively compact and fibrous (Garcia-Briones et al., 2006). On the other hand, FMDV precursor 3AB₁B₂B₃C has been proposed to facilitate the transport of viral protease 3C to the nucleus in infected cells (Capozzo et al., 2002).

Cells transiently expressing PV membrane-binding proteins, including 3A, showed a markedly reduced ability to support PV replication as a consequence of the modification of ER membranes, suggesting that a functional replication complex is formed *in cis*, in a coupled process involving viral translation, membrane modification and viral RNA synthesis (Egger et al., 2000). To investigate the functional role of the FMDV proteins encoded in the 3AB region, we have generated BHK-21 transformed cells that stably express 3A protein, or the precursors 3AB₁ and 3AB₁B₂B₃. The level of expression of 3A found in these cells was low, and no detectable cell alterations were observed in the clones analyzed by electron microscope. Interestingly, 3A clones produced higher viral titers upon FMDV infection. This effect was also observed in 3AB₁ and 3AB₁B₂B₃ clones, suggesting that expression of proteins from the 3AB region can specifically enhance viral replication. This stimulation was specific for

FMDV as it was not observed upon infection with encephalomyocarditis virus (EMCV) or vesicular stomatitis virus (VSV). In contrast, a decrease in FMDV, EMCV and VSV multiplication was observed in BHK-21 cells transiently expressing higher levels of these proteins. Thus, while low levels of expression of 3AB proteins resulted in a specific increase of FMDV multiplication, an unspecific effect was found in cells transiently expressing higher levels of these proteins, in which a decrease of FMDV, EMCV and VSV yield was observed.

Results

Selection of BHK-21 clones stably expressing 3A, 3AB₁ or 3AB₁B₂B₃ proteins

To investigate the effect of 3A or 3A(B) proteins on FMDV multiplication cycle, we derived BHK-21 cell clones stably expressing 3A alone or as fusion protein with one or three copies of FMDV 3B. To this end, plasmid pPur alone or in combination with pRSV derivatives expressing 3A, 3AB₁ or 3AB₁B₂B₃ from C-S8c1 FMDV, was transfected into BHK-21 cells and used for selection of stable transfectants, resistant to puromycin (Pur^R). The effect of transgene expression on cell survival was estimated from the number and size (diameter) of Pur^R clones that expressed the corresponding FMDV transcript (Table 1). Relative to the results obtained with cells transfected with pPur (Pur clones) alone or in combination with pRSV/L (Luc clones), a lower number of clones was recovered in two independent experiments in co-transfections with plasmids expressing the FMDV transcripts. The percentage of clones that could be expanded to obtain confluent monolayers was also reduced. Transcription of FMDV specific RNAs in the expanded clones was first monitored by RT-PCR amplification of cytoplasmic RNA, and later confirmed by nucleotide sequencing at passage 8th. The percentage of viable clones that showed detectable levels of the specific FMDV RNA ranged from 82% (3A) to 53% (3AB₁) (Table 1). The growth rate of 3A(B) clones was not noticeably different from that of the control Pur and Luc clones.

Expression of FMDV proteins, estimated by western blotting, was detected in the clones positive for FMDV RNA (representative examples are shown in Fig. 1A). The level of protein expression in the different clones was, in all cases, significantly lower than that observed in transfected cells transiently expressing these proteins from pRSV derivatives (see Materials and Methods), as confirmed by the quantification of the intensity of the 3A-specific bands (Fig. 1A), suggesting that high levels of expression of proteins from the 3AB region could be detrimental for cell viability. Additional faint bands of a size corresponding to various 3AB products were observed, as

Table 1

Selection of BHK-21 clones stably expressing 3A or 3A(B) FMDV proteins and its effect on cell growth

Plasmid	Pur ^R ^a	Colony size ^b	Growth Capacity(%) ^c	Transcript detection (%) ^d
None (mock)	0/0	-	-	-
pPur	57/76	L	98	0 (8)
pRSV/L	51/75	L/M	92	0 (8)
pRSV/3A	33/64	M/S	62	82 (14)
pRSV/3AB ₁	24/35	S/M	48	53 (10)
PRSV/3AB ₁ B ₂ B ₃	27/29	M/L	58	67 (17)

^a Number of cell clones visualized by crystal violet staining after 12 days of seeding at a 1:10 dilution of the initially co-transfected cells on a 100 mm Ø dish. The results of two independent experiments are presented.

^b Average size of Pur^R clones: L, large (1.5–3 mm); M, medium (1–1.5 mm); S, small (0.5–1 mm). The first letter indicates the predominant colony size.

^c Percentage of clones that were efficiently expanded to yield a monolayer of 4–6 × 10⁶ cells on a 60 mm Ø dish.

^d Percentage of viable clones yielding positive RT-PCR amplification of the corresponding FMDV transcript. The number of clones positive for RT-PCR is indicated in brackets.

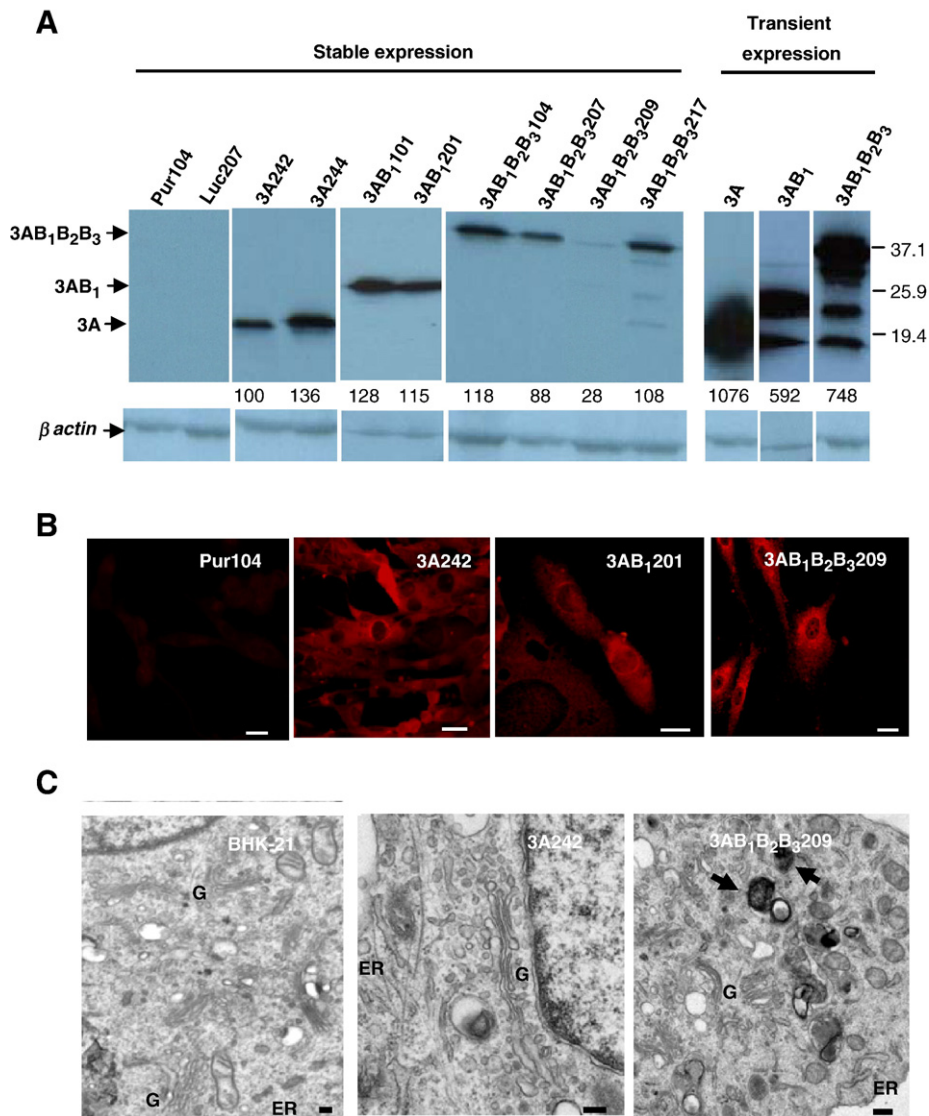


Fig. 1. Specific expression of FMDV proteins. (A) Western blot detection of 3A protein, using MAb 2C2, in transformed clones or in BHK-21 cells transiently expressing 3AB proteins. Pur104 and Luc207 correspond to two different negative controls, stably expressing only puromycin resistance or puromycin and luciferase, respectively. For transient expression, BHK-21 cells were processed at 24 h pt with the pRSV derivatives expressing the proteins indicated. In each case, the expression levels (intensity of the 3A/3A(B) protein band) given as percentage of that of clone 3A242, is indicated at the bottom of each line. Immunoblotting of β -actin was included as control of protein loading. (B) Representative microscope images of the distribution of 3A fluorescence in clones stably expressing 3A/3A(B) proteins. Cells were processed for immunofluorescence staining using MAb 2C2 (Bar: 20 μ m). (C) Electron microscopy images of BHK-21 cells and clones stably expressing 3A242 and 3AB₁B₂B₃209. Endo-membrane systems corresponding to endoplasmic reticulum (ER) and the Golgi apparatus (G) are indicated. Arrows point to residual vesicles accumulated in clone 3AB₁B₂B₃209. Bar: 0.2 μ m.

reported previously (Garcia-Briones et al., 2006). The identity of these bands, which could result from cleavage by cellular proteases, was confirmed in transfected cells transiently expressing the 3AB products, by immunoblotting with MAb 1F8 targeted to 3B (data not shown). The amount of these proteins in the transformed cells was below the detection level of this antibody.

Stable expression of proteins from the 3AB region does not induce major cell rearrangements

FMDV 3A protein associates to membrane extracts from infected cells (Moffat et al., 2005), in which alterations of endomembranes, including the formation of vesicles of an unclear origin, have been reported (Garcia-Briones et al., 2006; Knox et al., 2005; Monaghan et al., 2004). To investigate whether expression of 3A or 3A(B) proteins induced alterations in cell membrane structures, we first performed immunofluorescence analysis. As shown in Fig. 1B, cells expressing proteins of the 3A region showed positive reaction in the cytoplasm

with the specific anti-3A antibody, with a perinuclear distribution. Second, the EM images of negative stained cells from clones 3A242 and 3AB₁B₂B₃209 revealed no major changes in the endomembrane system when compared to control BHK-21 cells, in which the integrity of the ER and the Golgi was maintained. The analysis of 3AB₁B₂B₃209 cells showed an accumulation of lysosomes and residual vesicles that could suggest alterations in the degradative pathways (Fig. 1C).

Thus, no gross alterations of BHK-21 cell structures, including endomembranes as those observed during FMDV infection, were found in cells stably expressing 3A or 3A(B) proteins.

FMDV multiplication is specifically increased in cells expressing 3A, 3AB₁ or 3AB₁B₂B₃ proteins

To address the effect of the stable expression of proteins from the 3AB region on the FMDV multiplication cycle, we first analyzed virus plaque formation. To this end, monolayers of clones expressing these proteins were infected with FMDV isolate C-S8c1 (50 PFU) and the

virus plaques developed after 24 h were scored. In general, an increase was observed in the PFU recovered from monolayers expressing 3A or 3A(B) proteins. The percentages of PFU increase (PI) observed in each of the 36 clones expressing 3A, 3AB₁ or 3AB₁B₂B₃, relative to the PFU scored in the control Pur clones (average from 4 clones) – which were

undistinguishable from those of a duplicate of BHK-21 cells infected in parallel (data not shown) – are summarized in Fig. 2A. Four additional control Luc clones gave PI ranging from 0 to 7%, supporting a lack of effect of the clonal selection on FMDV susceptibility. Except for five clones whose PI ranged from 10–50, the PFU values in the remaining

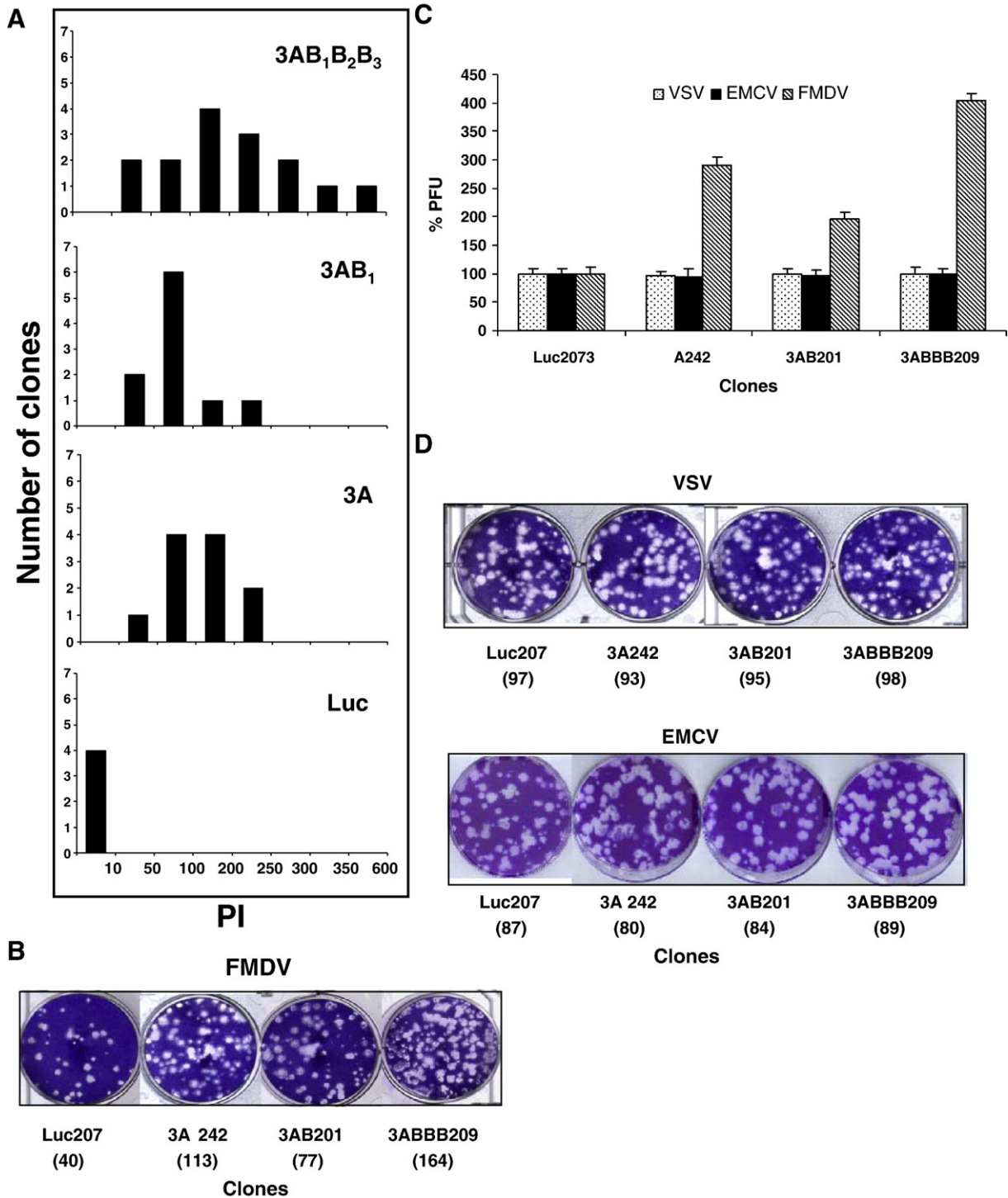


Fig. 2. Effect on virus plaque formation of the stable expression of FMDV 3A proteins. (A) Frequency distribution of PFU increase (PI) upon infection of clones stably expressing 3A, 3AB₁ or 3AB₁B₂B₃. PI values are represented against the number of clones analyzed that survived puromycin selection in each group. Confluent monolayers were infected with about 50 PFU of FMDV and the virus plaques developed were scored at 24 h pi. PI values were calculated relative to the PFU recovered in the control Luc clones. SD was lower than 15% in all cases. The PI values for the clones analyzed in Fig. 1A were: 3A242 (207), 3A244 (120), 3AB₁101 (90), 3AB₁201 (102), 3AB₁B₂B₃104 (27), 3AB₁B₂B₃207 (234), 3AB₁B₂B₃209 (300) and 3AB₁B₂B₃217 (146). (B) Representative examples of FMDV PFU recovered in clones expressing 3A/3A(B) proteins (plaque counts are given in parenthesis). (C) The percentage of PFU recovered after infection with about 100 PFU / monolayer of VSV, EMCV or FMDV in clones expressing 3A/3A(B) proteins, relative to those recovered in the control Pur clones. Results with clone Luc207 are included. The means and SD from three independent experiments are shown. (D) Representative examples of VSV or EMCV plaques, recovered upon infection with about 100 PFU of each virus in clones expressing 3A/3A(B) proteins (plaque counts are given in parenthesis).

31 FMDV-specific clones (86%) were significantly higher (t-student for multiple comparisons, $p \leq 0.05$) than those of the control clones. The highest PI frequency was found for clones expressing 3AB₁B₂B₃. An inverse correlation between the amount of FMDV protein detected in individual clones and the corresponding PI values was noticed (Fig. 1A and legend of Fig. 2A). Thus, clone 3AB₁B₂B₃104, which showed a high level of 3AB₁B₂B₃ expression, induced a low (27%) PI while clone 3AB₁B₂B₃209, which showed a low expression level, exhibited one of the highest (300%) PI observed.

The specificity for FMDV of this increase in PFU was confirmed for clones 3A242, 3AB₁201 and 3AB₁B₂B₃209. When monolayers of these clones were infected with VSV, an unrelated rhabdovirus, or with the picornavirus EMCV, the number of plaques and their size was similar to those developed by the infected control clones, Luc207 (Fig. 2C and D) and Pur104 (data not shown). Thus, stable expression of the protein 3A specifically enhanced FMDV plaque formation in BHK-21 clones. This specific effect was also observed when the protein 3A was fused to 3B.

To further address the effect on the viral growth of the stable expression of proteins from the 3AB region, the virus titers recovered upon FMDV C-S8c1 infection of clones expressing 3A and 3AB₁B₂B₃ were used to estimate the increase in viral yield, compared with the titers recovered from 4 independent Pur and Luc control clones. While no major morphological differences were observed in 3A(B)-infected clones relative to infected control clones, an advanced CPE (about 1 hour) was noticed by light microscopy. No significant differences were found in the virus titers recovered from control clones, which were undistinguishable from those of a duplicate of BHK-21 infected in parallel (data not shown). As shown in Fig. 3A, the highest titer increases were observed at 4 h pi, with differences up to ten-fold relative to the mean of control clones that, in all cases, were statistically significant, being the level of significance lower for clones expressing higher amounts of FMDV protein (i.e. clones 3A244 or

3AB₁B₂B₃104) (Fig. 3B). This increase was also observed at later infection times to a lesser extent at 8 h pi, including 18 and 24 h pi, when cells had developed extensive cytopathic effect. Infected clones expressing 3AB₁B₂B₃ showed, in average, higher titer increases (Fig. 3), being 3AB₁B₂B₃209 the highest. These results were in agreement with those obtained in the PFU assay (see Fig. 2A). Again, the virus production exhibited by clones 3AB₁B₂B₃104 and 3AB₁B₂B₃209 correlated inversely with the expression level of the corresponding FMDV proteins (Fig. 1A).

To assess whether the increase in PFU recovery and virus yield correlated with the level of detection of FMDV capsid proteins, extracts from infected monolayers of 3A or 3AB₁B₂B₃ clones were analyzed by western blot, using a MAb targeted to the capsid protein VP1. As shown in Fig. 4A, relative to the control Pur104, clones 3A242 and 3AB₁B₂B₃209 showed higher intracellular levels of VP1 at the different times post infection analyzed. Likewise, an increase in the percentage of cells positive for VP1 detection by immunofluorescence was observed from 2 h pi. in monolayers infected with FMDV (Fig. 4B). This increase in the percentage of infected cells was specific for FMDV, as it was not detected in cells infected with VSV (data not shown).

The enhancement of proteins 3A or 3AB₁B₂B₃ on viral yield is not due to a factor released to the growth medium

To address whether 3A and 3A(B) proteins were released from cells to the supernatant, facilitating subsequent infection events, we first analyzed the presence of FMDV 3A in the supernatant of transformed cell monolayers. To this end, supernatant aliquots (corresponding to about 2×10^7 cells) were dialysed and then concentrated. To control protein stability in the concentration steps, immunoblotting of Pur104 supernatant supplemented with crude protein extracts from 3A or 3AB₁B₂B₃ clones (containing about 40 µg) was included in parallel. The

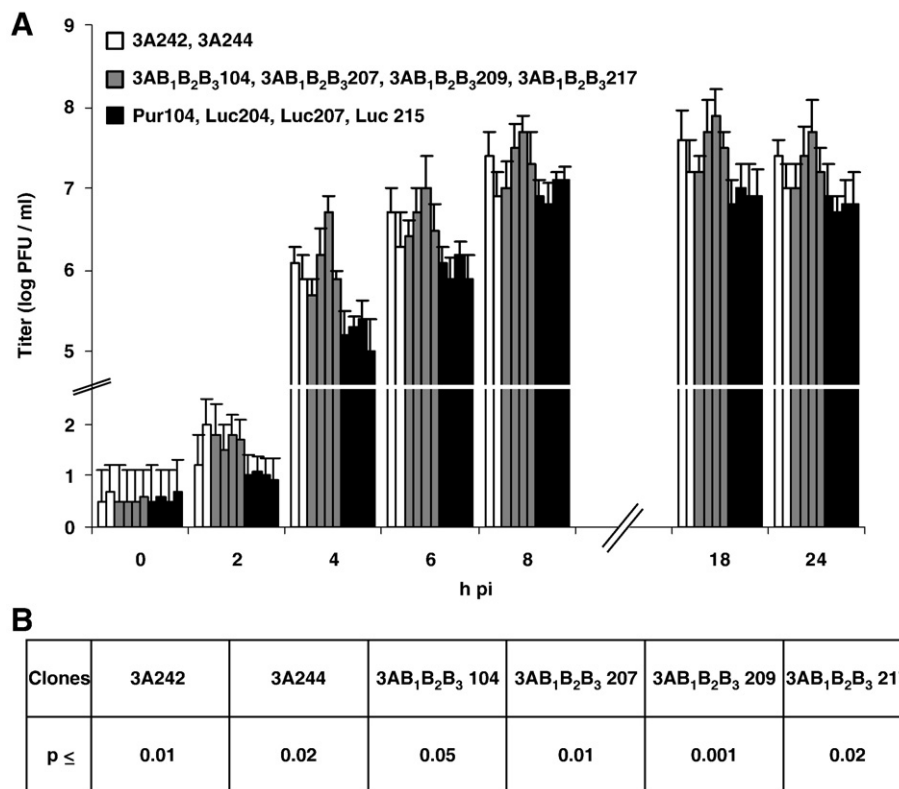


Fig. 3. FMDV yield in infected clones expressing 3AB proteins. (A) Time course of FMDV production in clones infected at a MOI of about 1. Four Luc and Pur control clones are included. The means and SD from three independent experiments are shown. (B) Significance (p values, obtained with the Student's t test for multiple comparisons) of the differences, at 4 h pi, among the mean of control clones and each of the 3A(B)-expressing clones analyzed.

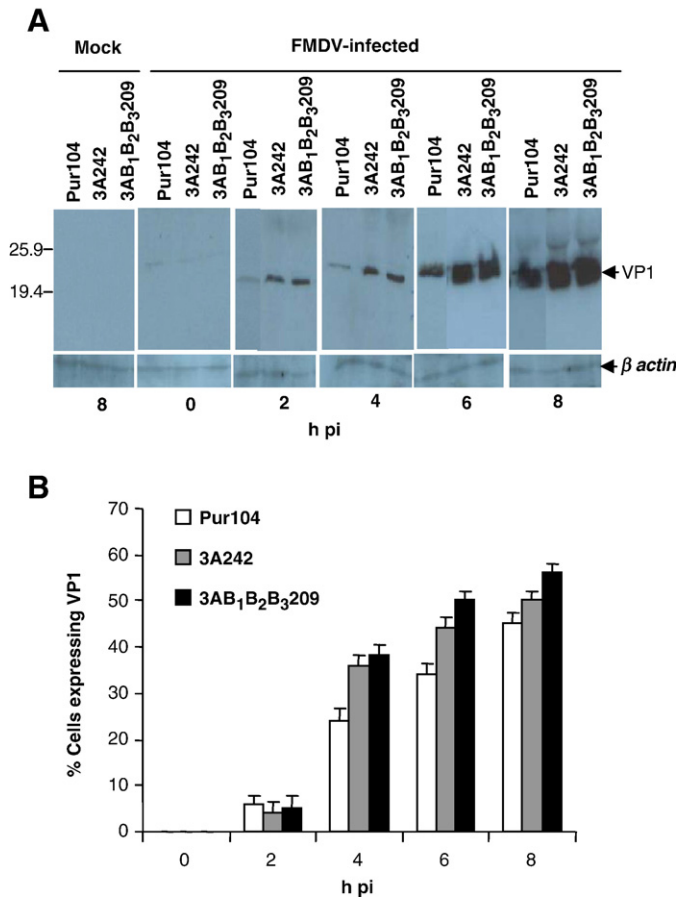


Fig. 4. Expression of VP1 capsid protein in FMDV infected 3A and 3A(B) clones. (A) Detection of VP1 protein in cell extracts collected at different h pi (MOI of about 1) by western blotting using MAb SD6. Immunoblotting of β -actin was included as control of protein loading. (B) Percentage of cells expressing VP1 at different h pi (MOI of about 10) detected by fluorescence. The means and SD from two independent experiments are presented.

results, shown in Fig. 5A, indicated that 3A was not secreted to the supernatant in amounts above $4 \mu\text{g}/2 \times 10^7$ cells, which was the lower limit of detection in this experimental approach. A similar analysis in BHK-21 cells transiently expressing high amounts of 3A or 3AB₁B₂B₃ proteins was also negative (data not shown).

To further analyze the possibility that small amounts of 3A protein, below the detection level of western blotting, were exerting a functional role on subsequent virus infection, we determined the % of virus yield in BHK-21 cells growing in the presence of purified FMDV 3A protein. The results indicated that addition of a wide range of 3A (4 to 100 μg) to growing cell monolayers did not modify production of FMDV plaques (Fig. 5B). Likewise, addition of supernatant from cells transiently expressing 3A or 3AB₁B₂B₃ proteins to BHK-21 monolayers did not modify virus yield (data not show).

Stable expression of 3A or 3AB₁B₂B₃ proteins does not stimulate FMDV IRES-dependent translation

To determine whether the increase of FMDV yield described above resulted from an effect on IRES-driven translation, the earliest intracellular event during picornavirus gene expression (Belsham and Martínez-Salas, 2004), clones expressing 3A or 3AB₁B₂B₃ proteins were used to assay FMDV IRES-dependent translation efficiency. As shown in Fig. 5C, no stimulation of internal initiation was observed in clones expressing 3A or 3AB₁B₂B₃ proteins, relative to control clones. This result was in agreement with previous reports on the effect of PV 3A protein mutations that caused defective viral RNA synthesis,

producing small plaques without modification of translation and polyprotein processing in cell-free systems.

Transient expression of proteins from the 3AB region induces a decrease of FMDV, EMCV and VSV multiplication

PV 3A transient expression has been shown to result in a markedly reduced ability of HeLa cells to support PV replication (Egger et al., 2000).

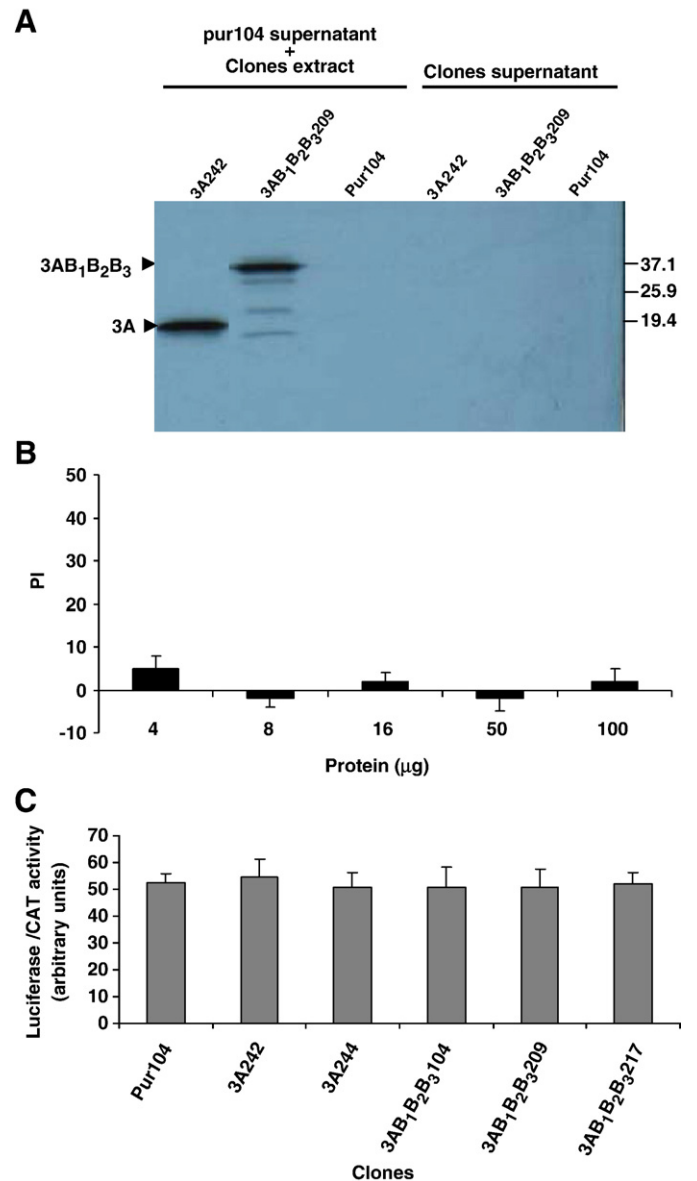


Fig. 5. Analysis of the release of 3AB proteins from FMDV clones. Effect on FMDV growth and IRES-dependent expression. (A) Analysis of FMDV 3A/3A(B) release to the cell supernatant. Western blot detection of 3A protein, using MAb 2C2, in concentrated supernatants of 2×10^7 cells stably expressing the indicated proteins. As a control of protein stability in the concentration steps, blotting of Pur104 supernatant supplemented with the indicated clone extracts containing FMDV 3A or 3AB₁B₂B₃ protein (about 40 μg) was included. (B) Effect of purified FMDV 3A protein addition to the supernatant on virus yield. BHK-21 cells (about 2×10^6 cells, 35 mm \emptyset plate) grown in the presence or absence of the indicated amount of purified FMDV 3A protein were infected with FMDV (about 100 PFU/monolayer). The PFU developed were scored at 24 h pi and PI values were calculated relative to the PFU recovered in BHK-21 grown in absence of purified 3A protein. (C) Effect of FMDV 3A/3A(B) protein expression on FMDV IRES-dependent translation efficiency. IRES-dependent translation was estimated as luciferase activity normalized to CAT activity, measured in extracts from 3A or 3AB₁B₂B₃ clones transfected with CMVpBIC bicistronic plasmid, relative to the value obtained in Pur104 transfected clones. The results were expressed in arbitrary units, error bars correspond to the SEM from two duplicated experiments.

To study whether the effect on FMDV multiplication of 3A or 3A(B) proteins could lead to different effects during transient expression, pRSV derivatives expressing 3A, 3AB₁ or 3AB₁B₂B₃, were transfected in BHK-21 cells. The levels of protein expression estimated by western blotting

were higher than those observed in stable expression (Fig. 1A), being the highest levels detected at 18 to 24 h pi (data not shown). These high protein levels induced a detrimental effect in BHK-21 cells, as indicated by a 20 to 30 % reduction in cell viability at 24 h pi (data not shown).

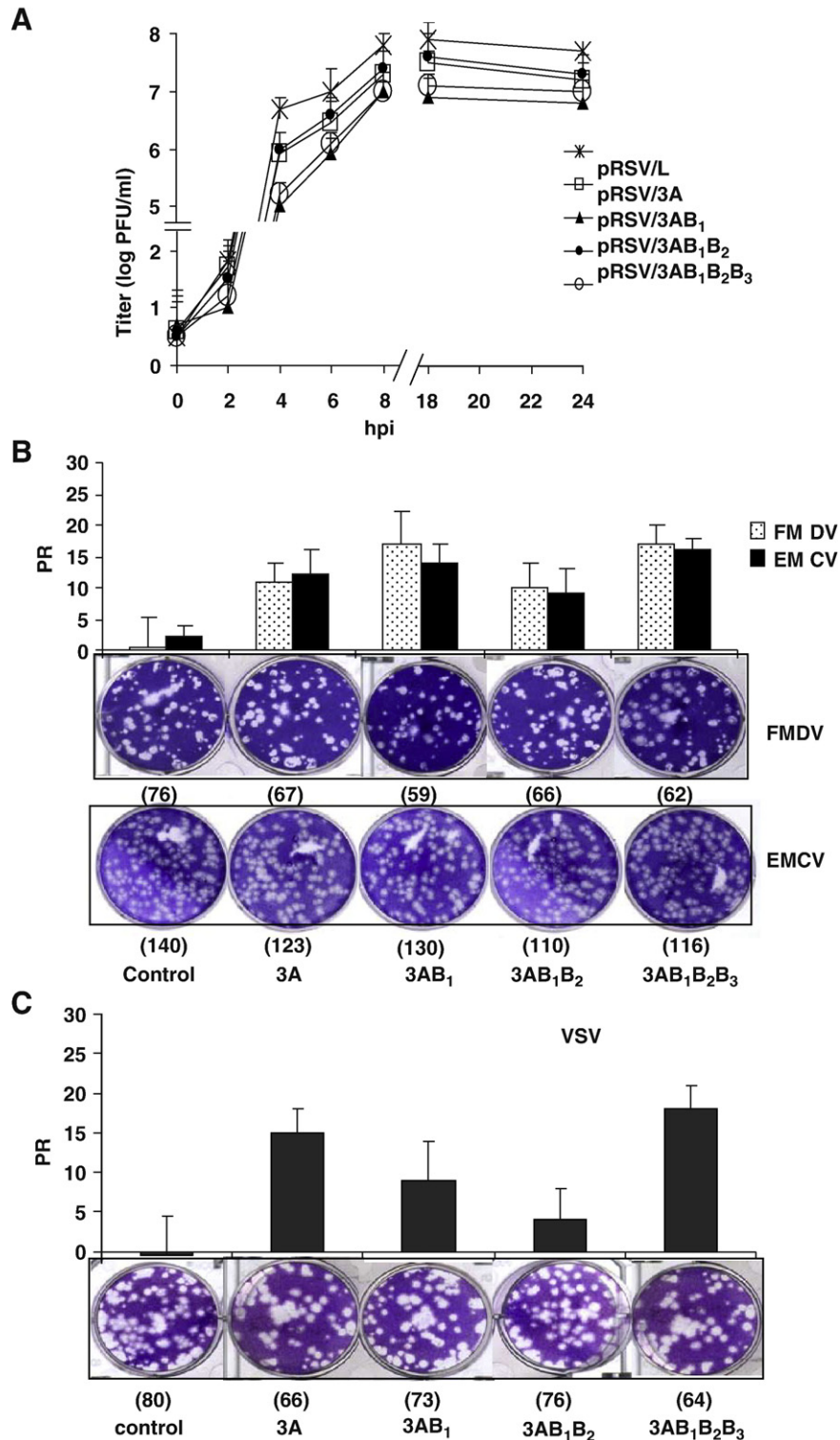


Fig. 6. Effect of transient expression of 3AB proteins on FMDV and VSV multiplication in BHK-21 cells. (A) Time course of FMDV titers recovered in the supernatants of transfected cells infected with FMDV (MOI of about 1). BHK-21 cells transfected with pRSV/L were included as control. The differences in virus titer observed at 4 h pi in cells expressing each of the four proteins from the 3AB region was significantly lower than that of control cells ($p \leq 0.001$). (B) FMDV and EMCV plaque formation in transfected cells. Monolayers, infected with about 100 PFU/monolayer of the indicated virus, were grown in the presence of agar. The PFU developed were scored at 24 h pi. PR values were calculated relative to the PFU recovered in cells transfected with pRSV/L. Non-transfected BHK-21 cells were included as control. Representative examples of the PFU recovered are shown (plaque counts are given in parenthesis). (C) VSV plaque formation. Cells were infected with VSV and processed as in (B). In all cases, the means and SD from three independent experiments are shown (plaque counts are given in parenthesis).

When BHK-21 cells transfected with pRSV/L were infected (at 16 h pt) with C-58c1 FMDV, the viral titers in culture medium were undistinguishable from those found in mock-transfected cells, at any time-points analyzed (data not shown). Conversely, a reduction in the virus yield, relative to cells transfected with pRSV/L, was observed in cells transiently expressing FMDV 3A or 3A(B) proteins (Fig. 6A) at the different infection times. The virus titers were slightly lower in cells expressing 3AB₁ and 3AB₁B₂B₃ than in those expressing 3A and 3AB₁B₂ (Fig. 6A). Similar reductions were observed in the capacity to produce FMDV plaques. In these assays, cells transiently expressing 3AB₁ and 3AB₁B₂B₃ exhibited the higher plaque reduction (PR) values, and no significant difference in the plaque size was observed (Fig. 6B). Similar results were obtained with 3A and 3A(B) transfected IBRS cells, a porcine line (data not shown). The magnitude of virus titer decrease was slightly lower than the virus titer increase observed in infected 3A/3A (B) clones.

The inhibition of the virus multiplication was not specific for FMDV, as indicated by the PR observed upon EMCV (Fig. 6B) and VSV (Fig. 6C) infection. In the VSV case, cells expressing 3AB₁B₂B₃ showed the higher PR value, which was similar (17%) to that found for FMDV (Fig. 6C). Thus, in contrast to what observed in clones stably expressing proteins from the 3AB region, transient expression of 3A, 3AB₁, 3AB₁B₂ and 3AB₁B₂B₃ results in a reduction of the FMDV yield and plaque formation in BHK-21 cells. This inhibitory effect extends also to the picornavirus EMCV and the RNA virus

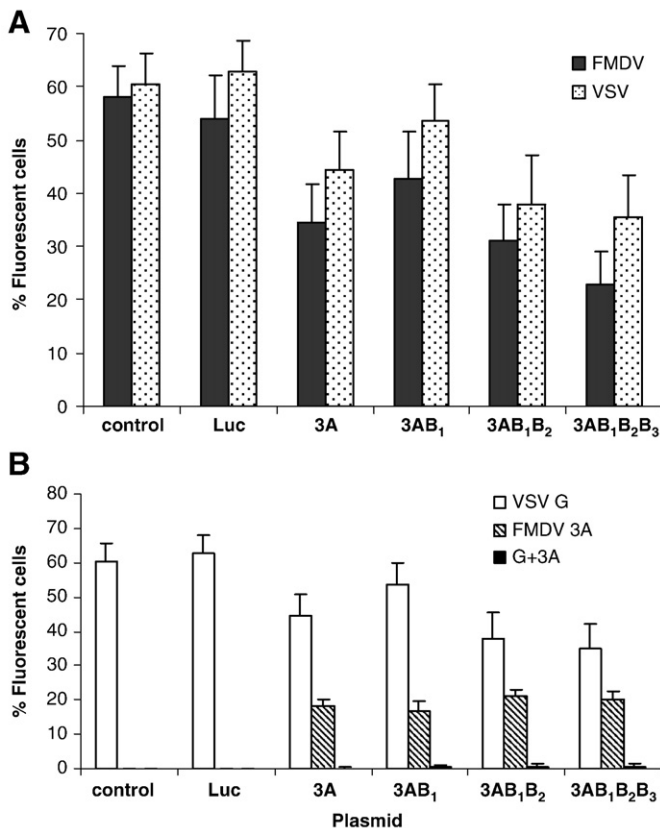


Fig. 7. Correlation between transient expression of 3A/3A(B) proteins and infection of single BHK-21 cells. Transfected monolayers, including those with pRSV/L (Luc), were infected (at 16 h pt) with FMDV or VSV (MOI of about 10). Non-transfected BHK-21 cells were included as control. After 4 h, the percentage of cells expressing 3A, VP1 (for FMDV infection) or G protein (for VSV infection) was monitored, using polyclonal serum 163 and MAb SD6 or 11, respectively. (A) Percentage of cells expressing VP1 (FMDV) or G (VSV) proteins. (B) Percentage of VSV infected cells expressing 3A, G or both proteins. In A and B, the mean and SD from two independent experiments (about 1000 cells were scored in each of them), are presented.

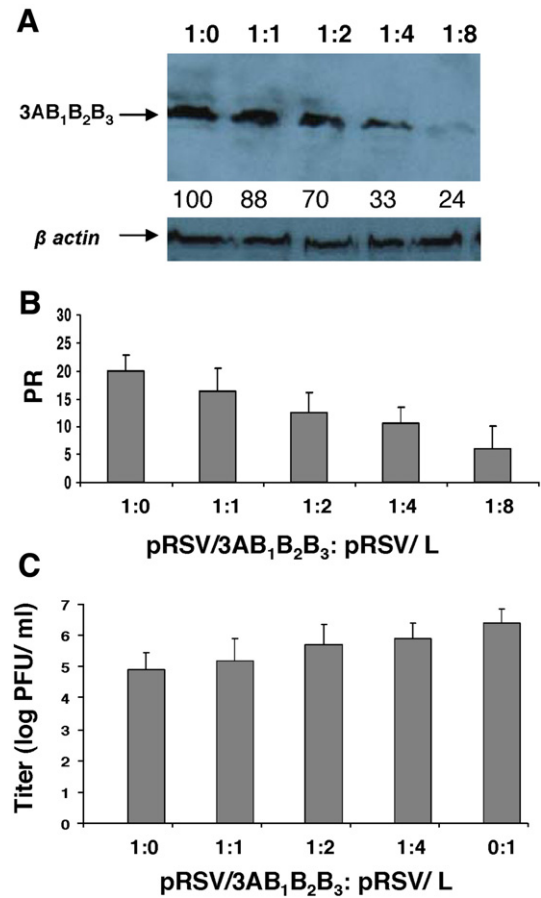


Fig. 8. Dose-effect inhibition of FMDV growth by transient expression of 3AB₁B₂B₃. (A) Modulation of 3AB₁B₂B₃ transient expression. Western blot detection of 3A protein, using MAb 2C2, in cell monolayers at 24 h post transfection with different ratios of pRSV/3AB₁B₂B₃ : pRSV/L. The expression level (intensity of the 3AB₁B₂B₃ protein band) given as percentage of that of cells transfected with pRSV/3AB₁B₂B₃ alone (1:0) is indicated at the bottom of each line. Immunoblotting of β -actin was included as control of protein loading. (B) FMDV plaque formation. Transfected cells, as in A, were infected with about 100 PFU/monolayer in the presence of agar. The PFU developed were scored at 24 h pi. PR values were calculated relative to the PFU recovered in cells transfected with pRSV/L (0:1). (C) Virus titers recovered from supernatants of transfected cells, as in A, at 4 h pi with FMDV (MOI of about 1).

VSV, indicating that a non FMDV-specific mechanism/s is involved in this inhibitory effect.

Single cells transiently expressing 3AB proteins show a decreased level of FMDV infection

To determine whether transient expression of 3A, 3AB₁, 3AB₁B₂ or 3AB₁B₂B₃ affected also the levels of FMDV protein synthesis in infected cells, the percentage of BHK-21 cells exhibiting VP1 fluorescence in infected monolayers was determined. Under the infection conditions used (MOI of 10), about 50% of the control cells transfected with pRSV/L were positive for VP1, while this percentage was reduced in cells expressing 3AB proteins (Fig. 7A) that ranged from 40% (3AB₁) to 25% (3AB₁B₂B₃). Similar reductions in cells positive for glycoprotein G fluorescence were observed upon infection of transfected cells with VSV (Fig. 7A). Double immunofluorescence assays indicated that a majority of cells showing intense green fluorescence to 3A did not exhibit red fluorescence to either FMDV VP1 or VSV G proteins. In VSV infected cells, a quantitative analysis was possible, as expression of 3A or 3A(B) products could only be due to plasmid transfection. The results obtained indicated that fluorescence to VSV G protein was detected in less than 1% of

cells expressing detectable levels of 3A or 3A(B) proteins (Fig. 7B). Thus, immunofluorescence detection of 3A/3A(B) proteins correlated with a lack of progress of VSV and FMDV infection.

Inverse correlation between transient expression level of proteins from the 3AB region and decrease of FMDV multiplication

To address whether the expression level of 3A(B) proteins in transfected cells influenced the extent of decrease of FMDV multiplication, BHK-21 cells were transfected with different ratios of pRSV/3AB₁B₂B₃ to pRSV/L. As shown in Fig. 8A, decreasing ratios (1:1 to 1:8) of pRSV/3AB₁B₂B₃ resulted in the expression of lower amounts of 3AB₁B₂B₃ protein. The level of 3AB₁B₂B₃ protein detection correlated with a decreasing trend in the PR observed upon FMDV infection of transfected cells (Fig. 8B), as well as with an increase in the virus yield recovered at 4 h pi (Fig. 8C). A similar trend was observed in the virus yield recovered at 6 and 8 h pi (data not shown). Thus, these results support a direct dose-effect of the inhibition exerted by the transient expression of 3AB₁B₂B₃ protein.

Discussion

Here, we report the characterization of stable BHK-21 clones that express FMDV 3A, 3AB₁ and 3AB₁B₂B₃ proteins. To our knowledge, this is the first description among picornaviruses of selection of viable cells stably expressing proteins from this viral genomic region. The clones generated in this work provide a useful tool to study the role of proteins from the 3AB region in FMDV replication and its interaction with host cell components. The percentage of 3A or 3A(B) clones that were efficiently expanded to yield a monolayer (around 60%) was lower than that of control Pur and Luc clones, and appeared associated with low, but detectable, levels of protein expression. These results demonstrate that low levels of expression of these proteins are compatible with cell viability. No major cell rearrangements were found in clones stably expressing 3A, 3AB₁ and 3AB₁B₂B₃ (Fig. 1C), although the increase in lysosomes and residual vesicles observed in the EM images of cells from clone 3AB₁B₂B₃209 (Fig. 1C), suggests that expression of these proteins could exert a certain level of toxicity. In addition, no evidence of alterations in the distribution of gp74 protein, a *cis*-Golgi marker whose pattern results relocated upon FMDV infection (García-Briones et al., 2006), of the ER marker calreticulin and of the patterns of actin fibers and microtubules were observed in the 3A/3A(B) clones.

The low levels of 3A/3A(B) protein expression detected specifically enhanced viral yield, and plaque formation as well, upon FMDV infection. In addition, enhancement of both the amount of VP1 capsid protein and the percentage of cells expressing detectable levels of this protein was observed. The increase in virus yield was specific for FMDV, as it was not observed in clones infected with the related picornavirus EMCV or with VSV, an unrelated rhabdovirus, whose PFU were similar in number and size to those developed by control clones. These results suggest that blocking of unspecific anti-viral mechanisms, such as interferon (Chinsangaram et al., 1999; Thacore, 1978), do not play a relevant role in the increase of FMDV replication. On the other hand, the low dispersion of the FMDV titers among control clones (Luc and Pur) and its similarity to that of uncloned BHK-21 cells, points against: i) selection of pre-existing BHK-21 cells with a lower FMDV susceptibility, and ii) the decreased susceptibility being the result of an adaptation to the clonal selection itself.

A trend towards detection of lower amounts of 3A/3A(B) products in clones supporting higher levels of FMDV multiplication was noticed. Thus, one of the clones, 3AB₁B₂B₃209, that showed a higher susceptibility to FMDV infection, expressed a low level of 3AB₁B₂B₃ protein (see Figs. 1A, 2A and 3). Indeed, transfection of clone 3AB₁B₂B₃209 with pRSV/3AB₁B₂B₃, resulted in a 14% reduction of the PI determined upon FMDV infection (data not shown), indicating

that the enhancement of viral multiplication was, partially reversible and that this reversion was likely be due to a higher expression level of the 3A(B) protein. These results suggest that, in the absence of major cell rearrangements, low levels of 3AB proteins expressed *in trans* can specifically stimulate FMDV multiplication in BHK-21 cells. This effect could be mediated by alterations of cell components not detected in our analyses and/or by an enhancement of virus replication due to the presence in infected cells of pre-existing levels of 3A/3A(B) proteins. On the other hand, the effect of these proteins on viral yield only occurs when present intracellularly prior to virus infection (Figs. 5A, B).

In picornavirus infected cells translation of the viral message that depends on an internal ribosome entry site (IRES)-mediated mechanism (Martínez-Salas et al., 2008) is the first intracellular event, and therefore precedes viral RNA replication (Belsham and Martínez-Salas, 2004). A potential role of 3A protein in viral RNA translation was discarded by the lack of effect on FMDV-IRES dependent translation in any of the clones analyzed (Fig. 5C). Uridylylated 3B is required to initiate picornavirus RNA synthesis (Andino et al., 1993; Lyle et al., 2002; Towner et al., 1996) and for FMDV, the three 3B copies can be uridylylated *in vitro* (Nayak et al., 2005). Assuming that 3A(B) proteins expressed *in trans* can be uridylylated in the context of FMDV infection, the availability of 3B precursor in the 3AB₁ and 3AB₁B₂B₃ clones could contribute to the increase in FMDV replication. However, clones expressing 3A alone also showed similar levels of FMDV multiplication increase. In other picornaviruses the 3AB protein can be involved in both *cis* and *trans* acting functions. In PV, while P3 precursor, but not 3AB protein, can complement *in trans* RNA replication-defective mutants in 3A in a cell-free translation/replication assay (Towner et al., 1998), complementation of a 3B uridylylation-deficient mutant has been reported when 3AB, but not 3B or 3BC, was provided *in trans* using a dicistronic system in HeLa cells (Cao and Wimmer, 1995; Liu et al., 2007). Also, the growth of hepatitis A virus mutants with an impaired 3AB/3ABC processing can be enhanced by co-expressing 3AB or 3ABC (Kusov and Gauss-Muller, 1999). Likewise mutations in PV 3A protein producing decrease in virus yield do not affect translation, polyprotein processing, uridylylation of VPg or synthesis of negative-strand RNA, but markedly reduces positive-strand RNA synthesis (Teterina et al., 2003). Concerning FMDV 3A and 3A(B), further work is required to understand the mechanism underlying the increase in susceptibility promoted by the low levels of expression of these proteins to subsequent infection.

A different effect on virus multiplication was found in cells transiently expressing proteins from the 3AB region at levels that were, in average, seven-fold higher than those found in 3A/3A(B) clones, in spite of only about 20% of transfected cells showing detectable fluorescence to 3A. Under these high expression conditions, and as reported for PV replication (Egger et al., 2000), a non-specific inhibitory effect on FMDV yield was observed. Thus, the PFU and virus yield recovered upon FMDV infection were lower than in control transfected cells. The inhibition exerted by 3A/3A(B) transient expression affected, to a similar extent, the growth of EMCV and VSV. For both viruses, the number but not the size, of the PFU recovered upon infection was shown to be reduced, suggesting that the virus blockage induced by 3A/3A(B) mostly affects early steps of virus infection and that, once a cell becomes infected, the virus growth is similar to that of control cells. Consistently, quantitative analysis of infected cells expressing VP1 or G protein indicated that a majority of cells exhibiting high levels of 3A/3A(B) transient expression did not result productively infected by either FMDV or VSV, at times in which most of the control cells did. This inhibitory effect would become bypassed by the high amount of virus produced by non-transfected cells. A lack of type I IFN receptors and/or of functional effector pathways for these molecules has been reported for BHK-21 cells (Chinsangaram et al., 1999; Lam et al., 2005). Indeed, growth of BHK-21 cells in acid-treated culture

medium from BHK-21 cells infected with FMDV (Chinsangaram et al., 1999) did not affect PFU recovery upon subsequent infection with FMDV or VSV (data not shown). Thus, induction of type I interferon is not likely involved in the viral inhibition observed in transfected cells.

The stable clones generated in this work provide a tool to investigate the mechanism underlying the effect in susceptibility to FMDV infection induced *in trans* by different levels of expression of proteins from the 3A region. Taken together, the results shown here indicate that 3A enhancing effect observed in transformed clones is independent of cell membranes rearrangements, it is unrelated to a factor release to the extracellular medium, and it appears to operate at a virus multiplication step posterior to the first rounds of viral RNA translation.

Materials and methods

Cells, viruses, antibodies and proteins

BHK-21 cells were grown as described (Sobrinho et al., 1983). Viruses FMDV C-S8c1 (Sobrinho et al., 1983), EMCV, kindly provided by L. Carrasco (CBMSO, Spain), and VSV, Indiana isolate (Novella et al., 1996), were grown and titrated as previously described (Rosas et al., 2003). The following antibodies to FMDV proteins were used: MAb SD6 to VP1 (Mateu et al., 1987), MAb 2C2 to 3A and 1F8 to 3B (De Diego et al., 1997) and polyclonal serum 163, produced by rabbit immunization with three consecutive injections of 3A recombinant protein (R. Armas, unpublished results). MAb I1 was used to detect VSV glycoprotein G (Lefrançois and Lyles, 1982); cell protein markers were detected using MAb AC-74 to β -actin (Sigma), MAb CC92 to the *cis*-Golgi network protein gp74 (Alcalde et al., 1994), rabbit polyclonal serum to the ER marker calreticulin (Abacam) and to β II-tubulin (Armas-Portela et al., 1999), and Alexa Fluor 488-labelled phalloidin (Molecular Probes). Horse radish peroxidase (HRP)-conjugated protein A (Sigma), HRP-conjugated rabbit anti-mouse IgG and horse anti-rabbit IgG (Amersham), and goat anti-mouse or anti-rabbit IgG coupled to Alexa Fluor 594 or 488 (Molecular Probes) were used as secondary antibodies. A C-S8c1 FMDV 3A protein expressed from the pRSET vector (Núñez et al., unpublished results) and purified through a Ni-NTA Agarose (Qiagen) column (Hata et al., 2000) was used to assess its effect on the susceptibility of BHK-21 cells to FMDV infection.

Stable cell transformation and transient expression of FMDV proteins

cDNAs spanning FMDV 3A, 3A_{B1} or 3A_{B1}B₂B₃C coding region (Toja et al., 1999) were used to replace the luciferase gene in plasmid pRSV/L (de Wet et al., 1987) downstream of the Rous Sarcoma Virus (RSV) LTR promoter, as described (García-Briones et al., 2006). For stable cell transformation, plasmids (5 μ g) were co-transfected with pBSpac Δ p (pPur) (de la Luna et al., 1988) at a molar ratio of 3:1 in BHK-21 cells (60 mm \emptyset dish), as previously described (Rosas et al., 2003). Plasmid pPur encodes puromycin acetyltransferase, conferring resistance to puromycin. Cells resistant to puromycin (pur^R) (10 μ g/ml) were selected, and independent pur^R clones, obtained by limiting dilution, were expanded in the presence of puromycin (2.5 μ g/ml), to avoid loss of integrated DNAs (de la Luna and Ortin, 1992). Cell stocks were kept frozen in liquid N₂ for further analysis. All the Pur^R clones were stable, keeping the expression of the corresponding FMDV genes for, at least 10 serial passages, including more than 4 freezing and thawing cycles.

For transient expression assays, BHK-21 cells were transfected with pRSV derivatives expressing 3A, 3A_{B1}, 3A_{B1}B₂ or 3A_{B1}B₂B₃ using lipofectamine plus (GIBCO, BRL), as described (García-Briones et al., 2006).

Amplification and sequencing of FMDV RNA

Cell monolayers (about 4 x 10⁶ cells), were lysed and the cytoplasmic RNA extracted, incubated with DNase RQ1 and RT-PCR amplified, as described (Rosas et al., 2003). Sequencing of 3A(B) RNA from positive clones was performed from amplified cDNAs, as reported (Baranowski et al., 2003) and confirmed the integrity of the corresponding FMDV transgene.

Virus yield assay

To assess the capacity of FMDV to grow in BHK-21 cells expressing FMDV 3A/3A(B) proteins, triplicates (about 5x10⁶ cells, 60 mm \emptyset plate) of monolayers at 16 h post-transfection (pt) or stably transformed clones cells were infected with FMDV C-S8c1 at a multiplicity of infection (MOI) – expressed as plaque forming units (PFU)/cell – of 1. After 1 h of adsorption, infection was allowed to proceed in DMEM supplemented with 4% FBS. Supernatant samples withdrawn at different times post-infection (pi) were used to estimate the viral titer (PFU/ml) on BHK-21 cells for transient expressions, or on Pur104 clone cells for stably transformed cells, as described (Bigeriego et al., 1999; Gutierrez et al., 1994). Results are the mean from three independent titer determinations.

Viral plaque assay

Determination of virus yield was performed as described (Gutierrez et al., 1993). Briefly, monolayers (about 5x10⁶ cells, 60 mm \emptyset plate) transiently transfected (16 h pt) or stably transformed cells were infected with FMDV (about 50 PFU), EMCV or VSV (about 100 PFU). At 24 h pi, cells were fixed and stained to determine the PFU developed. The percentage of virus yield reduction (PR) or virus yield increase (PI) was calculated as (PFU control – PFU) x 100 / PFU control, or as (PFU – PFU control) x 100 / PFU control, respectively, using the mean of three independent plaque assays. Cells transfected with pRSV/L for transient expression, or the average of four clones transformed with pPur alone for stably transformed cells were used as the control of PFU.

Protein detection

For western-blot, extracts were prepared from cell monolayers (35 mm \emptyset), proteins resolved on a 12% SDS-PAGE, transferred onto a nitrocellulose membrane and incubated with MAb 2C2 targeted to FMDV 3A (García-Briones et al., 2006). Membranes were incubated with HRP-coupled anti-mouse antibody and proteins subsequently detected using an ECL kit (Amersham). A Typhoon equipment and software ImageQuant TL (Amersham) were used for quantification of the intensity of protein. For detection of intracellular virus by immunofluorescence, infected monolayers were processed as described (García-Briones et al., 2006), using rabbit serum 163 to 3A, and MAbs SD6 and I1 to FMDV VP1 and VSV G proteins, respectively. Anti-rabbit or anti-mouse IgG coupled with Alexa Fluor 488 or 594 was used as secondary antibody.

Electron microscopy

Cells were grown on 100 mm \emptyset dishes, washed with PBS and fixed for 30 min in 1% glutaraldehyde, 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer pH 7.4 at room temperature, for 1 h. Then, cells were scrapped in 1 ml of 0.1 M phosphate buffer, 0.5% bovine serum albumin, postfixed in 1% osmium tetroxide plus potassium ferrocyanide for 1 h at 4 °C. After three washes with double distilled water, cells were treated with 0.15% tannic acid in phosphate buffer pH 7.4 for 1 min, washed again with buffer and twice with double distilled water prior the staining with 2% uranyl acetate for 1 h at room temperature. After three washes with double distilled water the samples were

dehydrated in ethanol following standard protocols and embedded in TAAB 812 resin (TAAB lab. Berkshire, England). Cell samples were examined using a JEM-1010 electron microscope (Jeol, Japan) and images were acquired using a digital camera Bioscan 792 (Gatan, Inc 5933 Coronado Lane, Pleasanton, CA 94588).

Analysis of 3A protein release to the growth medium

Supernatant samples (10 ml) were withdrawn from monolayers (about 2×10^7 cells, 100 mm ϕ plate) of either BHK-21 cells transiently expressing FMDV 3A or 3A₁B₂B₃ protein (16 h pt), or from stably transformed clones. Samples were supplemented with 1 mM PMSF and protease inhibitor cocktail (Roche), dialyzed at 4 °C for 24 h against 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4 (with changes every 8 h) and concentrated by freeze-drying until total dry up, for 24 h at -80°C and 0.07 mbar using a Virtis Sentry device. The samples were resuspended in Laemmli buffer and analyzed by western blot.

IRES-dependent translation activity

Bicistronic constructs (CMVpBIC) encompassing the FMDV IRES between the chloramphenicol acetyl transferase (CAT) and luciferase gene subcloned in pCDNA3 to generate transcripts from the CMV promoter, were transfected in stably transformed cells expressing 3A or 3A₁B₂B₃ proteins; as a control, Pur clones were transfected in parallel. Transfection of 80–90% confluent monolayers with CMVpBIC bicistronic plasmid was carried out using cationic liposomes as previously described (Lopez de Quinto et al., 2002). Extracts from 2×10^5 cells were prepared 20 h after transfection in 100 μ l of 50 mM Tris-HCl, pH 7.8, 120 mM NaCl, 0.5% NP-40. Luciferase and CAT activities were measured as described (Martinez-Salas et al., 1993). Assays were performed at least two times.

Acknowledgments

We wish to thank J.I. Núñez, G. León and M. González-Magaldi for cloning and expression of FMDV 3A protein, and M. Saiz for discussions and critical reading of the manuscript. We also thank M. Dávila and E. Domingo for providing us with VSV Indiana isolate and with MAb I1, E. Brocci for MAb 2C2 and I. Sandoval for MAb CC92. This work was supported by Spanish grants from CICYT (BIO2005-07592-CO2-01), MEC (CSD2006-07) (BFU-2005-00948), and by Fundación Severo Ochoa.

References

Alcalde, J., Egea, G., Sandoval, I.V., 1994. gp74 a membrane glycoprotein of the cis-Golgi network that cycles through the endoplasmic reticulum and intermediate compartment. *J. Cell Biol.* 124 (5), 649–665.

Andino, R., Rieckhof, G.E., Achacoso, P.L., Baltimore, D., 1993. Poliovirus RNA synthesis utilizes an RNP complex formed around the 5' end of viral RNA. *EMBO J.* 12 (9), 3587–3598.

Armas-Portela, R., Parrales, M.A., Albar, J.P., Martinez, A.C., Avila, J., 1999. Distribution and characteristics of betaIII tubulin-enriched microtubules in interphase cells. *Exp. Cell Res.* 248 (2), 372–380.

Bachrach, H.L., 1977. "Foot-and-mouth disease virus, properties, molecular biology and immunogenicity. Beltsville Symposia in Agricultural Research. I. Virology in Agriculture Allanheld, Osmun, Montclair, NJ.

Baranowski, E., Molina, N., Nunez, J.L., Sobrino, F., Saiz, M., 2003. Recovery of infectious foot-and-mouth disease virus from suckling mice after direct inoculation with in vitro-transcribed RNA. *J. Virol.* 77 (20), 11290–11295.

Beard, C.W., Mason, P.W., 2000. Genetic determinants of altered virulence of Taiwanese foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* 74 (2), 987–991.

Belsham, G.J., 2005. Translation and replication of FMDV RNA. *Curr. Top Microbiol. Immunol.* 288, 43–70.

Belsham, G.J., Martinez-Salas, E., 2004. Genome organization, translation and replication of foot-and-mouth disease virus. "Foot-and-mouth disease. Current perspectives." Horizon Bioscience, Norfolk, UK.

Bienz, K., Egger, D., Pasamontes, L., 1987. Association of poliovirus proteins of the P2 genomic region with the viral replication complex and virus-induced membrane synthesis as visualized by electron microscopic immunocytochemistry and autoradiography. *Virology* 160 (1), 220–226.

Bigeriego, P., Rosas, M.F., Zamora, E., Martinez-Salas, E., Sobrino, F., 1999. Heterotypic inhibition of foot-and-mouth disease virus infection by combinations of RNA transcripts corresponding to the 5' and 3' regions. *Antiviral Res.* 44 (2), 133–141.

Capozzo, A.V., Burke, D.J., Fox, J.W., Bergmann, I.E., La Torre, J.L., Grigera, P.R., 2002. Expression of foot and mouth disease virus non-structural polypeptide 3ABC induces histone H3 cleavage in BHK21 cells. *Virus Res.* 90 (1–2), 91–99.

Chinsangaram, J., Piccone, M.E., Grubman, M.J., 1999. Ability of foot-and-mouth disease virus to form plaques in cell culture is associated with suppression of alpha/beta interferon. *J. Virol.* 73 (12), 9891–9898.

Choe, S.S., Dodd, D.A., Kirkegaard, K., 2005. Inhibition of cellular protein secretion by picornaviral 3A proteins. *Virology* 337 (1), 18–29.

De Diego, M., Brocchi, E., Mackay, D., De Simone, F., 1997. The non-structural polyprotein 3ABC of foot-and-mouth disease virus as a diagnostic antigen in ELISA to differentiate infected from vaccinated cattle. *Arch. Virol.* 142 (10), 2021–2033.

de la Luna, S., Ortin, J., 1992. pac gene as efficient dominant marker and reporter gene in mammalian cells. *Methods Enzymol.* 216, 376–385.

de la Luna, S., Soria, I., Pulido, D., Ortin, J., Jimenez, A., 1988. Efficient transformation of mammalian cells with constructs containing a puromycin-resistance marker. *Gene* 62 (1), 121–126.

de Wet, J.R., Wood, K.V., DeLuca, M., Helinski, D.R., Subramani, S., 1987. Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.* 7 (2), 725–737.

Deitz, S.B., Dodd, D.A., Cooper, S., Parham, P., Kirkegaard, K., 2000. MHC I-dependent antigen presentation is inhibited by poliovirus protein 3A. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A* 97 (25), 13790–13795.

Doedens, J.R., Giddings Jr., T.H., Kirkegaard, K., 1997. Inhibition of endoplasmic reticulum-to-Golgi traffic by poliovirus protein 3A: genetic and ultrastructural analysis. *J. Virol.* 71 (12), 9054–9064.

Domingo, E., Mateu, M.G., Martínez, M.A., Dopazo, J., Moya, A., Sobrino, F., 1990. Genetic variability and antigenic diversity of foot-and-mouth disease virus. *Applied Virology Research. Virus variation and epidemiology.* 2. Academic Press Inc., London, New York.

Egger, D., Teterina, N., Ehrenfeld, E., Bienz, K., 2000. Formation of the poliovirus replication complex requires coupled viral translation, vesicle production, and viral RNA synthesis. *J. Virol.* 74 (14), 6570–6580.

Falk, M.M., Sobrino, F., Beck, E., 1992. VPg gene amplification correlates with infective particle formation in foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* 66 (4), 2251–2260.

Ferrer-Orta, C., Arias, A., Agudo, R., Perez-Luque, R., Escarmis, C., Domingo, E., Verdaguier, N., 2006. The structure of a protein primer-polymerase complex in the initiation of genome replication. *EMBO J.* 25 (4), 880–888.

Forss, S., Strebel, K., Beck, E., Schaller, H., 1984. Nucleotide sequence and genome organization of foot-and-mouth disease virus. *Nucleic Acids Res.* 12 (16), 6587–6601.

Garcia-Briones, M., Rosas, M.F., Gonzalez-Magaldi, M., Martin-Acebes, M.A., Sobrino, F., Armas-Portela, R., 2006. Differential distribution of non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus in BHK-21 cells. *Virology* 349 (2), 409–421.

Gutierrez, A., Martinez-Salas, E., Pintado, B., Sobrino, F., 1994. Specific inhibition of aphthovirus infection by RNAs transcribed from both the 5' and the 3' noncoding regions. *J. Virol.* 68 (11), 7426–7432.

Gutierrez, A., Rodriguez, A., Pintado, B., Sobrino, F., 1993. Transient inhibition of foot-and-mouth disease virus infection of BHK-21 cells by antisense oligonucleotides directed against the second functional initiator AUG. *Antiviral Res.* 22 (1), 1–13.

Hollister, J.R., Vagnozzi, A., Knowles, N.J., Rieder, E., 2008. Molecular and phylogenetic analyses of bovine rhinovirus type 2 shows it is closely related to foot-and-mouth disease virus. *Virology* 373 (2), 411–425.

Hope, D.A., Diamond, S.E., Kirkegaard, K., 1997. Genetic dissection of interaction between poliovirus 3D polymerase and viral protein 3AB. *J. Virol.* 71 (12), 9490–9498.

Irurzun, A., Perez, L., Carrasco, L., 1992. Involvement of membrane traffic in the replication of poliovirus genomes: effects of brefeldin A. *Virology* 191 (1), 166–175.

Knowles, N.J., Samuel, A.R., Davies, P.R., Kitching, R.P., Donaldson, A.I., 2001. Outbreak of foot-and-mouth disease virus serotype O in the UK caused by a pandemic strain. *Vet. Rec.* 148 (9), 258–259.

Knox, C., Moffat, K., Ali, S., Ryan, M., Wileman, T., 2005. Foot-and-mouth disease virus replication sites form next to the nucleus and close to the Golgi apparatus, but exclude marker proteins associated with host membrane compartments. *J. Gen. Virol.* 86 (Pt 3), 687–696.

Kusov, Y., Gauss-Muller, V., 1999. Improving proteolytic cleavage at the 3A/3B site of the hepatitis A virus polyprotein impairs processing and particle formation, and the impairment can be complemented in trans by 3AB and 3ABC. *J. Virol.* 73 (12), 9867–9878.

Lam, V., Duca, K.A., Yin, J., 2005. Arrested spread of vesicular stomatitis virus infections in vitro depends on interferon-mediated antiviral activity. *Biotechnol. Bioeng.* 90 (7), 793–804.

Lama, J., Paul, A.V., Harris, K.S., Wimmer, E., 1994. Properties of purified recombinant poliovirus protein 3aB as substrate for viral proteinases and as co-factor for RNA polymerase 3Dpol. *J. Biol. Chem.* 269 (1), 66–70.

Lama, J., Sanz, M.A., Rodriguez, P.L., 1995. A role for 3AB protein in poliovirus genome replication. *J. Biol. Chem.* 270 (24), 14430–14438.

Lefrançois, L., Lyles, D.S., 1982. The interaction of antibody with the major surface glycoprotein of vesicular stomatitis virus. II. Monoclonal antibodies of nonneutralizing and cross-reactive epitopes of Indiana and New Jersey serotypes. *Virology* 121 (1), 168–174.

Lopez de Quinto, S., Saiz, M., de la Morena, D., Sobrino, F., Martinez-Salas, E., 2002. IRES-driven translation is stimulated separately by the FMDV 3c-NCR and poly(A) sequences. *Nucleic Acids Res.* 30 (20), 4398–4405.

- Lyle, J.M., Clewell, A., Richmond, K., Richards, O.C., Hope, D.A., Schultz, S.C., Kirkegaard, K., 2002. Similar structural basis for membrane localization and protein priming by an RNA-dependent RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 277 (18), 16324–16331.
- Martinez-Salas, E., Saiz, J.C., Davila, M., Belsham, G.J., Domingo, E., 1993. A single nucleotide substitution in the internal ribosome entry site of foot-and-mouth disease virus leads to enhanced cap-independent translation in vivo. *J. Virol.* 67 (7), 3748–3755.
- Martinez-Salas, E., Pacheco, A., Serrano, P., Fernández, N., 2008. New insights into internal ribosome entry site elements relevant for viral gene expression. *J. Gen. Virol.* 89, 611–626.
- Mateu, M.G., Rocha, E., Vicente, O., Vayreda, F., Navalpotro, C., Andreu, D., Pedrosa, E., Giral, E., Enjuanes, L., Domingo, E., 1987. Reactivity with monoclonal antibodies of viruses from an episode of foot-and-mouth disease. *Virus Res.* 8 (3), 261–274.
- Moffat, K., Howell, G., Knox, C., Belsham, G.J., Monaghan, P., Ryan, M.D., Wileman, T., 2005. Effects of foot-and-mouth disease virus nonstructural proteins on the structure and function of the early secretory pathway: 2BC but not 3A blocks endoplasmic reticulum-to-Golgi transport. *J. Virol.* 79 (7), 4382–4395.
- Monaghan, P., Cook, H., Jackson, T., Ryan, M., Wileman, T., 2004. The ultrastructure of the developing replication site in foot-and-mouth disease virus-infected BHK-38 cells. *J. Gen. Virol.* 85 (Pt 4), 933–946.
- Nayak, A., Goodfellow, I.G., Belsham, G.J., 2005. Factors required for the Uridylylation of the foot-and-mouth disease virus 3B1, 3B2, and 3B3 peptides by the RNA-dependent RNA polymerase (3Dpol) in vitro. *J. Virol.* 79 (12), 7698–7706.
- Neznanov, N., Kondratova, A., Chumakov, K.M., Angres, B., Zhumabayeva, B., Agol, V.I., Gudkov, A.V., 2001. Poliovirus protein 3A inhibits tumor necrosis factor (TNF)-induced apoptosis by eliminating the TNF receptor from the cell surface. *J. Virol.* 75 (21), 10409–10420.
- Novella, I.S., Cilnis, M., Elena, S.F., Kohn, J., Moya, A., Domingo, E., Holland, J.J., 1996. Large-population passages of vesicular stomatitis virus in interferon-treated cells select variants of only limited resistance. *J. Virol.* 70 (9), 6414–6417.
- Nunez, J.L., Baranowski, E., Molina, N., Ruiz-Jarabo, C.M., Sanchez, C., Domingo, E., Sobrino, F., 2001. A single amino acid substitution in nonstructural protein 3A can mediate adaptation of foot-and-mouth disease virus to the guinea pig. *J. Virol.* 75 (8), 3977–3983.
- O'Donnell, V.K., Pacheco, J.M., Henry, T.M., Mason, P.W., 2001. Subcellular distribution of the foot-and-mouth disease virus 3A protein in cells infected with viruses encoding wild-type and bovine-attenuated forms of 3A. *Virology* 287 (1), 151–162.
- Pacheco, J.M., Henry, T.M., O'Donnell, V.K., Gregory, J.B., Mason, P.W., 2003. Role of nonstructural proteins 3A and 3B in host range and pathogenicity of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* 77 (24), 13017–13027.
- Pereira, H.G., 1981. Foot-and-mouth disease. Virus disease of food animals, 2 vols. Academic Press Inc., London.
- Rosas, M.F., Martinez-Salas, E., Sobrino, F., 2003. Stable expression of antisense RNAs targeted to the 5' non-coding region confers heterotypic inhibition to foot-and-mouth disease virus infection. *J. Gen. Virol.* 84 (Pt 2), 393–402.
- Ryan, M.D., Drew, J., 1994. Foot-and-mouth disease virus 2A oligopeptide mediated cleavage of an artificial polyprotein. *EMBO J.* 13 (4), 928–933.
- Semler, B.L., Anderson, C.W., Hanecak, R., Dorner, L.F., Wimmer, E., 1982. A membrane-associated precursor to poliovirus VPg identified by immunoprecipitation with antibodies directed against a synthetic heptapeptide. *Cell* 28 (2), 405–412.
- Sobrino, F., Davila, M., Ortin, J., Domingo, E., 1983. Multiple genetic variants arise in the course of replication of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *Virology* 128 (2), 310–318.
- Sobrino, F., Saiz, M., Jimenez-Clavero, M.A., Nunez, J.L., Rosas, M.F., Baranowski, E., Ley, V., 2001. Foot-and-mouth disease virus: a long known virus, but a current threat. *Vet. Res.* 32 (1), 1–30.
- Suhy, D.A., Giddings Jr., T.H., Kirkegaard, K., 2000. Remodeling the endoplasmic reticulum by poliovirus infection and by individual viral proteins: an autophagy-like origin for virus-induced vesicles. *J. Virol.* 74 (19), 8953–8965.
- Takegami, T., Kuhn, R.J., Anderson, C.W., Wimmer, E., 1983. Membrane-dependent uridylylation of the genome-linked protein VPg of poliovirus. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A* 80 (24), 7447–7451.
- Teterina, N.L., Rinaudo, M.S., Ehrenfeld, E., 2003. Strand-specific RNA synthesis defects in a poliovirus with a mutation in protein 3A. *J. Virol.* 77 (23), 12679–12691.
- Thacore, H.R., 1978. Effect of interferon on transcription and translation of vesicular stomatitis virus in human and simian cell cultures. *J. Gen. Virol.* 41 (2), 421–426.
- Toja, M., Escarmis, C., Domingo, E., 1999. Genomic nucleotide sequence of a foot-and-mouth disease virus clone and its persistent derivatives. Implications for the evolution of viral quasispecies during a persistent infection. *Virus Res.* 64 (2), 161–171.
- Towner, J.S., Ho, T.V., Semler, B.L., 1996. Determinants of membrane association for poliovirus protein 3AB. *J. Biol. Chem.* 271 (43), 26810–26818.
- Towner, J.S., Mazanet, M.M., Semler, B.L., 1998. Rescue of defective poliovirus RNA replication by 3AB-containing precursor polyproteins. *J. Virol.* 72 (9), 7191–7200.
- Xiang, W., Cuconati, A., Hope, D., Kirkegaard, K., Wimmer, E., 1998. Complete protein linkage map of poliovirus P3 proteins: interaction of polymerase 3Dpol with VPg and with genetic variants of 3AB. *J. Virol.* 72 (8), 6732–6741.
- Xiang, W., Harris, K.S., Alexander, L., Wimmer, E., 1995. Interaction between the 5'-terminal cloverleaf and 3AB/3CDpro of poliovirus is essential for RNA replication. *J. Virol.* 69 (6), 3658–3667.

Internalization of Swine Vesicular Disease Virus into Cultured Cells: a Comparative Study with Foot-and-Mouth Disease Virus^{∇†}

Miguel A. Martín-Acebes,¹ Mónica González-Magaldi,¹ Angela Vázquez-Calvo,¹
Rosario Armas-Portela,^{1,2} and Francisco Sobrino^{1,3*}

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM), Cantoblanco, Madrid, Spain¹; Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Cantoblanco, Madrid, Spain²; and Centro de Investigación en Sanidad Animal, INIA, Valdeolmos, Madrid, Spain³

Received 26 November 2008/Accepted 8 February 2009

We performed a comparative analysis of the internalization mechanisms used by three viruses causing important vesicular diseases in animals. Swine vesicular disease virus (SVDV) internalization was inhibited by treatments that affected clathrin-mediated endocytosis and required traffic through an endosomal compartment. SVDV particles were found in clathrin-coated pits by electron microscopy and colocalized with markers of early endosomes by confocal microscopy. SVDV infectivity was significantly inhibited by drugs that raised endosomal pH. When compared to foot-and-mouth disease virus (FMDV), which uses clathrin-mediated endocytosis, the early step of SVDV was dependent on the integrity of microtubules. SVDV-productive endocytosis was more sensitive to plasma membrane cholesterol extraction than that of FMDV, and differential cell signaling requirements for virus infection were also found. Vesicular stomatitis virus, a model virus internalized by clathrin-mediated endocytosis, was included as a control of drug treatments. These results suggest that different clathrin-mediated routes are responsible for the internalization of these viruses.

The ways in which viruses are internalized into host cells to initiate a productive infection are varied. Viruses gaining entry via endocytosis hijack components of different pathways used by the cell to internalize ligands such as nutrients and signaling molecules. The best-characterized route is classical clathrin-mediated endocytosis, in which ligands are internalized in clathrin-coated pits (CCPs) and subsequently sorted into early endosomes that can mature into late endosomes and lysosomes (71). Distinct CCP subpopulations, defined by using different, specific adaptor proteins, have recently been reported (7). Other non-clathrin-mediated endocytosis routes, dependent on plasma membrane cholesterol-enriched microdomains called lipid-rafts, have been also characterized (50). These lipid-rafts are enriched in glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins and, when containing caveolin-1, this pathway is commonly referred as caveola-mediated endocytosis. In addition, viruses using alternative entry pathways that do not correspond to clathrin or lipid-raft/caveola-mediated endocytosis have been reported (11, 50, 77).

Virus infection is a reproducible and easily measurable event, so viruses can act as useful endocytic tracers (65). In fact, much of the information about caveolae-mediated endocytosis has been obtained from the study of virus entry and infection (63). Recent reports show that closely related viruses can enter into the cell via different pathways, whereas viruses of different families can exploit similar mechanisms, highlighting the importance of understanding the cell biology of virus entry (19). Comparative studies of the internalization of dif-

ferent viruses have revealed differential dependence on dynamin, an endocytosis-associated protein (24), as well as the differential involvement of Rab5 and Rab7 GTPases in intracellular virus trafficking and infection (76). Other studies comparing ligands for caveola-mediated endocytosis, such as that seen with viruses and cholera toxin, have uncovered diversity in caveola-mediated endocytosis routes (64, 66). In the present study, we have analyzed the internalization pathway of swine vesicular disease virus (SVDV), and we have performed a comparative analysis with foot-and-mouth disease virus (FMDV) and vesicular stomatitis virus (VSV). SVDV is a porcine pathogen and a member of the *Picornaviridae* family; it is included into the *Enterovirus* genus and is closely related to the human pathogen coxsackievirus B5 (CVB5) (91). FMDV is a typical species of the *Aphthovirus* genus within the *Picornaviridae* family (80), and VSV is a member of the genus *Vesiculovirus* of the family *Rhabdoviridae* (70). Despite the marked differences exhibited by the three viruses at the taxonomical level and in their requirements to organize replication complexes, these viruses share similar growth kinetics on IBRS-2 cells, and the vesicular lesions and clinical signs of the disease they produce in natural hosts are so similar as to require a differential diagnosis (2, 51).

SVDV and FMDV virions are composed of an icosahedral capsid of about 26 nm in diameter, built up with 60 copies of each of the four structural proteins (VP1 to VP4). The capsid contains a single-stranded RNA molecule of positive polarity that constitutes the viral genome (27, 82, 87). VSV is a negative-stranded RNA virus whose virions are much more complex and enveloped by lipid bilayers (70).

SVDV can infect cultured cells using heparan sulfate (HS) proteoglycans as surface receptors, via the coxsackievirus-and-adenovirus receptor (CAR), and some isolates retain the ability to bind human decay-accelerating factor (DAF) (26, 34).

* Corresponding author. Mailing address: CBMSO, UAM, Cantoblanco 28049, Madrid, Spain. Phone: 34-91-1964493. Fax: 34-91-1964420. E-mail: fsobrino@cbm.uam.es.

† Dedicated to the memory of Rosario Armas-Portela.

∇ Published ahead of print on 18 February 2009.

After attachment to the cell, SVDV particles undergo receptor-induced conformational alterations that expose the N-terminal portion of VP1 that is internal within the capsid (33); this interaction with CAR is responsible for the conformational capsid rearrangements in related coxsackieviruses (55). Internalization through different endocytic pathways has been reported among the SVDV-related coxsackieviruses. Thus, a clathrin-dependent mechanism is exploited by a CVB3 strain that only uses CAR as a cell receptor (18), and a caveola-mediated, dynamin-independent route that shares common features with macropinocytosis has been reported for another CVB3 strain that uses both DAF and CAR as cell receptors (15, 16). Also, a CVB3 variant entering through HS has been shown to be internalized in a pH-dependent way (90), whereas a CVB4 strain interacting with DAF and CAR is endocytosed via a lipid-raft-dependent mechanism (85).

In contrast, FMDV binds different α_v integrins as surface receptors, specifically $\alpha_v\beta_3$ in IBRS-2 cells, the cell line used in the present study (12), and it is internalized following the clathrin endocytic route (8, 52, 61). Early work suggested phosphatidylserine as the VSV cell receptor (72), but recent observations do not support this hypothesis (13). However, it is well established that VSV is internalized through clathrin-mediated endocytosis and has become a model virus internalized through this route (36, 52, 54, 84).

Our results indicate that SVDV is internalized into the cell by a mechanism which can be inhibited by treatments that affect clathrin-mediated endocytosis and also requires traffic through an endosomal compartment for penetration. Supporting this hypothesis, SVDV particles were found in CCPs in electron microscopy studies, colocalized with markers of early endosomes by confocal microscopy, and SVDV infectivity could be significantly inhibited by drugs that raise endosomal pH. The early step of SVDV and VSV infection—but not that of FMDV—was dependent on the integrity of microtubules, and SVDV-productive endocytosis was more sensitive to plasma membrane cholesterol extraction than those of FMDV and VSV. Taken together, these results suggest that different endosomal routes are responsible for the internalization of these viruses into different populations of early endosomes.

MATERIALS AND METHODS

Cells and viruses. IBRS-2 cells (22) and BHK-21 cells (ATCC) were maintained in Dulbecco modified Eagle medium (DMEM) (Gibco-BRL) supplemented with 5% fetal calf serum (Sigma), L-glutamine (2 mM), penicillin (100 U/ml), and streptomycin (100 μ g/ml). SVDV SPA/1/93 isolate was grown on IBRS-2 cells. Type C FMDV C-S8c1 (81) and VSV Indiana serotype viral stocks were prepared by amplification in BHK-21 cells. Type C FMDV C-S8c1 isolate entered cells using α_v integrins, but not HS (6, 53, 59). Nucleotide sequencing confirmed the absence of mutations responsible for HS binding acquisition (6) in the viral stock used in the present study, which was unable to infect CHO cells that do not express integrin receptors for FMDV but are susceptible to infection by FMDV mutants that bind HS (6; data not shown).

Antibodies and reagents. The following antibodies against viral proteins were used: monoclonal antibody (MAb) I1 anti-VSV G protein (47), MAb 2H12 against VP1 SVDV (9), rabbit polyclonal antiserum against VP1 SVDV (33), and MAb 5C4 against FMDV antigenic site D (45). MAb against EEA1, rabbit polyclonal antiserum against caveolin-1, and a phospho-specific MAb against Tyr¹⁴-phosphorylated caveolin-1 were from BD Transduction Labs. MAbs against tubulin (DM1A) and β -actin (AC-15) were from Sigma. A rabbit polyclonal anti- β II tubulin antiserum (4) and MAb 25H8 to the *cis*-Golgi marker protein gp74 (1) were also used. Alexa Fluor 488-conjugated phalloidin; Alexa Fluor 488-conjugated transferrin (TF); Alexa Fluor 488-, 594-, or 555-labeled

goat anti-mouse immunoglobulin G (IgG); and Alexa Fluor 488- or 594-labeled goat anti-rabbit IgG were purchased from Invitrogen. Anti-mouse and anti-rabbit horseradish peroxidase-coupled IgG secondary antibodies were from GE Healthcare.

Bisindolmaleimide I (Bis), cytochalasin D (Cyt D), concanamycin A, filipin III, genistein, methyl- β -cyclodextrin (M β CD), α -cyclodextrin (α CD), lovastatin, nocodazole, wortmannin, chlorpromazine (Cpmz), and sodium orthovanadate (OV) were from Sigma. PP2 in solution was purchased from Calbiochem. Sucrose and ammonium chloride (NH₄Cl) were from Merck. Bis, Cyt D, concanamycin A, filipin, Geneticin, lovastatin, nocodazole, wortmannin, and dynasore were dissolved in dimethyl sulfoxide. OV and NH₄Cl were dissolved in water. Cpmz, sucrose, M β CD, and α CD were directly prepared in DMEM.

Drug treatments. Preinfection analyses were performed in the presence of drugs before infection (pretreatment) and during the whole infection period (except for sucrose, concanamycin A, M β CD, and α CD), while for postinfection analyses the drug was added 3 h postinfection. Monolayers of IBRS-2 cells grown on tissue culture plates were extensively washed with DMEM and pretreated for 30 min with Bis (5 μ M), Cyt D (1 μ M), filipin (1 μ g/ml), concanamycin A (1,000 nM), dynasore (80 μ M), genistein (100 μ M), M β CD (10 mM), α CD (10 mM), nocodazole (40 μ M), wortmannin (200 nM), Cpmz (30 μ M), OV (1 mM), or sucrose (0.45 M) or for 1 h in the case of NH₄Cl (25 or 50 mM in 25 mM HEPES [pH 7.4]), PP2 (10 μ M), lovastatin (5 μ M), or nystatin (25 μ g/ml). For sucrose and concanamycin A treatment, the drug was maintained only during pretreatment and the first infection hour or TF internalization period. M β CD and α CD were only present during 30 min preinfection. The rest of the drugs were maintained throughout the infection to avoid cellular recovery. To evaluate the effect of the treatments on virus replication (postinfection), all of the drugs were added 3 h postinfection and maintained during the rest of infection, except M β CD, sucrose and concanamycin A, which were removed 0.5 and 1.5 h after their addition, respectively. Control cells were incubated in parallel with the same volume of drug solvent.

Infections and virus titrations. Triplicate wells of IBRS-2 cells pretreated or not with the drugs were infected with VSV, SVDV, or FMDV using a multiplicity of infection (MOI) of 0.5 PFU/cell in experiments measuring the productive virus infection or an MOI of 100 PFU/cell in experiments tracking virus entry by immunofluorescence or to determine caveolin-1 phosphorylation. After the first infection hour, the viral inoculum was removed, and fresh medium containing 5% fetal calf serum was added (this time point was considered 1 h postinfection). For dynasore treatment, infections were performed in medium without serum since this drug binds to serum proteins, losing activity (49). Seven hours later, cells were subjected to three freeze-thaw cycles, and the total (intracellular and medium-released) virus yield was determined by plaque assay (in BHK-21 cells for VSV and FMDV or in IBRS-2 cells for SVDV), as described previously (81). Infected monolayers were also fixed and processed for immunofluorescence to determine the number of infected cells (51). Experiments in which the first hour of infection was carried out on ice to allow virus adsorption, but not internalization, are indicated in the figure legends.

TEM. Transmission electron microscopy (TEM) was performed as described previously (51). IBRS-2 cells grown on 100-mm tissue culture plates were incubated with VSV (MOI of 300) or SVDV (MOI of 63) for 1 h on ice and subsequently transferred to 37°C for 5 min. Cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and fixed for 30 min at 37°C in 2% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.4) supplemented with 5 mM CaCl₂, postfixed in 1% osmium tetroxide plus 1% potassium ferrocyanide for 1 h at 4°C, and treated with 0.15% tannic acid in phosphate buffer (pH 7.4) for 1 min. Samples were stained with 2% uranyl acetate for 1 h at room temperature, dehydrated in ethanol according to standard protocols, and embedded in TAAB 812 resin (TAAB Laboratories). Samples were examined with a JEOL JEM-1010 electron microscope operating at 80 kV, and images were acquired by using a digital camera Bioscan792 (Gatan).

Immunofluorescence and confocal microscopy. Cells grown on glass coverslips were washed with PBS, fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min at room temperature (or methanol fixed for Golgi staining), blocked, and permeabilized with PBTG buffer (0.1% Triton X-100, 1% bovine serum albumin [BSA], and 1 M glycine in PBS) for 15 min at room temperature. Samples were incubated with primary antibodies diluted in 1% BSA in PBS for 1 h at room temperature, washed with PBS, and incubated with secondary antibodies 30 min at room temperature. After washing with PBS, nuclei were stained with 1 μ g of DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole; Invitrogen)/ml or by using To-Pro-3 (Invitrogen) in the case of confocal microscopy, and the samples were mounted in Fluoromount G (Southern Biotech). To determine the number of infected cells, three coverslips per treatment were examined, counting at least 300 cells per coverslip.

Samples were observed by using an Olympus BX61 epifluorescence microscope coupled to a digital camera DP70 and acquired by using Olympus DP controller software. Confocal laser scanning microscopy was performed with an Axiovert S100 TV microscope (Zeiss) coupled to a confocal Radiance 2000 system (Bio-Rad) using Lasersharp2000 5.2 software (Bio-Rad) for image acquisition. Sequential laser scanning for different laser lines was performed to avoid false colocalization. Images were processed using Adobe Photoshop 7.0.1 (Adobe Systems, Inc.).

For quantification of colocalization, the percentage of EEA1-positive structures (red) containing SVDV (green) was calculated by counting the number of EEA1-positive structures containing yellow pixels, divided by the total number of EEA1 spots in at least three different cells for each time. The same process was performed for SVDV colocalization with TF.

TF internalization assays. Cells grown on coverslips were incubated for 15 min with 10 μ g of TF-Alexa Fluor 488/ml in DMEM containing 0.5% BSA. To evaluate the effect of sucrose and Cpmz in TF endocytosis, the cells were washed with 200 mM acetic acid and 200 mM NaCl and sequentially with 150 mM NaCl, 20 mM HEPES (pH 7.4), 10 mM glucose, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, and 1 mM CaCl₂ to eliminate extracellular TF (48) prior to fixation. Aldehyde fluorescence was quenched by incubating cells 15 min with 1 M glycine in PBS. Images of TF in cells treated or not with the drugs were acquired using the same exposure time and detector sensitivity.

AO vital staining. Acridine orange (AO) vital staining (52) was used to qualitatively evaluate the effects of NH₄Cl treatment on acidic organelles. Cells treated as described above were incubated in fresh medium, containing or not NH₄Cl, and 5 μ g of AO/ml at 37°C for 10 min, washed three times with the same medium without AO, and observed under a fluorescence microscope. AO fluorescence is red when it protonates and accumulates into acidic organelles.

Filipin staining. Detection of cellular cholesterol by filipin staining was performed as previously reported (39). Briefly, cells treated or not with M β CD were fixed on ice and incubated with 125 μ g of filipin/ml in PBS at room temperature, washed twice with PBS, and mounted in Fluoromount G. Images of cells treated or not with M β CD were acquired using the same exposure time and detector sensitivity. The fluorescence intensity of filipin staining in control and M β CD-treated cells was quantified with ImageJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

Western blot. IBRS-2 cells grown on 35-mm tissue culture plates were scraped on ice into NP-40 lysis buffer (10 mM EGTA, 2.5 mM MgCl₂, 1% NP-40, 20 mM HEPES [pH 7.4]) and sonicated. Protein concentration was determined by Bradford method, and equal amounts of protein mixed with Laemmli sample buffer were boiled, separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, and transferred onto a nitrocellulose membrane. The membrane was blocked, and proteins were detected by incubation with primary antibodies and with horseradish peroxidase-coupled secondary antibodies using a chemiluminescence kit (Perkin-Elmer) as previously described (28).

Data analysis. To probe statistical significance of the data, one-way analysis of the variance was performed with statistical package SPSS 13.0 (SPSS, Inc.) for Windows. For multiple comparisons, Bonferroni's correction was applied. The data are presented as means \pm the standard deviations, and statistically significant differences between control treatments and drug treatments are indicated in the figures by one or two asterisks (corresponding to $P < 0.05$ or $P < 0.005$, respectively).

RESULTS

SVDV is internalized through clathrin-mediated endocytosis. To test the role of CCPs in SVDV endocytosis, cells were treated with a hypertonic medium containing 0.45 M sucrose. This treatment has been shown to inhibit CCP assembly (30) and to reduce infection by viruses that use clathrin-mediated endocytosis (8, 38). Sucrose treatment reduced the ability of IBRS-2 cells to internalize TF (Fig. 1A), a ligand known to utilize clathrin-mediated endocytosis (29, 56). Cpmz interferes with plasma membrane CCP formation (88) and inhibits virus infection that uses clathrin mediated-endocytosis, including VSV and FMDV (36–38, 60, 61, 84). Treatment with Cpmz reduced TF internalization (Fig. 1B). As estimated by confocal microscopy, sucrose and Cpmz reduced internalization of SVDV into the cells but did not impair virus binding (Fig. 1C), since fluorescence corresponding to virions is observed at the

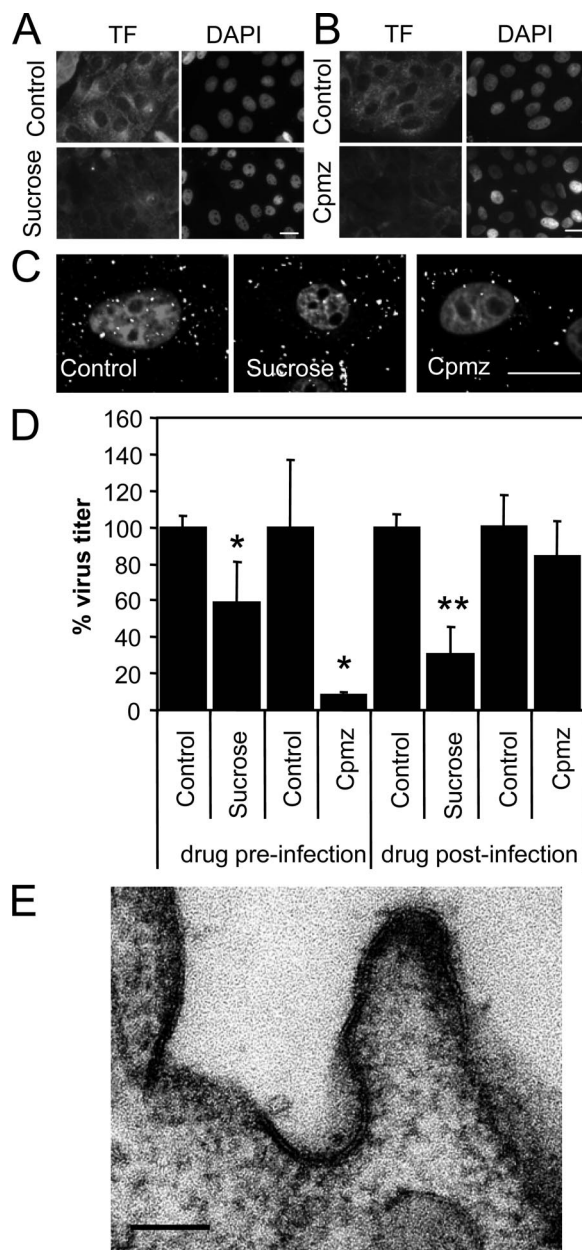


FIG. 1. Role of clathrin for SVDV endocytosis in IBRS-2 cells. (A) Hypertonic medium inhibits TF endocytosis. Cells pretreated 30 min with sucrose were incubated 15 min with Alexa Fluor 488-labeled TF maintaining the sucrose, acid washed to eliminate extracellular TF, and fixed. (B) Cpmz inhibits TF endocytosis. Cells pretreated 30 min with chlorpromazine were incubated as for panel A with fluorescent TF. (C) Sucrose and Cpmz inhibit internalization of SVDV. Confocal sections of IBRS-2 cells were pretreated with sucrose or Cpmz and incubated with SVDV (MOI of 100) for 25 min at 37°C. SVDV was detected by immunofluorescence staining with rabbit polyclonal anti-serum against VP1 and a secondary antibody labeled with Alexa Fluor 488. Nuclei were stained with To-Pro-3. (D) Effect of sucrose and Cpmz treatment on SVDV infection determined by plaque assay. (E) TEM of SVDV-infected cells. IBRS-2 cells were incubated with SVDV (MOI of 300) for 1 h on ice prior to incubation for 5 min at 37°C, fixed, and processed for electron microscopy. White bars (A to C), 20 μ m; black bar (E), 100 nm. Statistically significant differences between control and drug treatments are indicated by one asterisk ($P < 0.05$) or two asterisks ($P < 0.005$).

plasma membrane. Preinfection treatment with sucrose reduced SVDV (40%) virus production (Fig. 1D). In this assay, sucrose was not present during the postinfection period; therefore, the effect observed is likely due to inhibition of entry. However, when sucrose was added 3 h postinfection, a virus titer reduction was also observed, indicating that hypertonic medium affects also virus replication. Preinfection treatment with Cpmz caused a marked inhibition of SVDV yield (Fig. 1D). When Cpmz was added postinfection, reduction in SVDV infection was not statistically significant. These results confirm that the drug was affecting an early step of SVDV infection cycle. Attempts to use more specific inhibitors such as dominant-negative Eps15, dynamin II, or Rab5 resulted in very low levels of transfection of IBRS-2 cells that impaired the analyses.

SVDV particle location during the internalization process was studied by means of TEM. Electron-dense, spherical virus-like particles ~26 nm in diameter, corresponding to SVDV virions, were located in the CCPs (ca. 84% of the particles undergoing endocytosis), and a representative example is shown in Fig. 1E. These particles were not found in mock-infected cells. The lack of antibodies suitable for gold-labeling impaired detection by TEM immunostaining of viral capsid proteins in these particles. Taken together, these results support a clathrin-mediated endocytosis for SVDV internalization.

Infection of SVDV requires transit through acidic endosomes. After internalization, viruses release their genetic material penetrating into the host cell cytoplasm and leading to a productive infection. A common uncoating mechanism used by viruses entering through CCP-mediated endocytosis depends on endosomal acidification (50, 58, 66). Pretreatment with NH_4Cl resulted in a neutralization of intraluminal pH within acidic organelles, as estimated by the lack of detection of red spots corresponding to acidic organelles labeled by AO vital staining (Fig. 2A). As reported earlier (52, 54), preinfection treatment with NH_4Cl significantly reduced VSV and to a lower extent FMDV titers, as well as the percentage of infected cells (Fig. 2B). This compound also reduced SVDV infection in a dose-dependent manner. Postinfection addition of NH_4Cl had no effect on virus infection (data not shown), suggesting that a transit through an acidic compartment is required for the productive entry of these three viruses. Indeed, pretreatment with concanamycin A, a potent and specific inhibitor of the vacuolar ATPase (25), reduced SVDV infection (Fig. 2C); this was not observed when this drug was added postinfection (data not shown; for a comparison of the effects of concanamycin A in FMDV and VSV infection, see reference 52). These results led us to study SVDV infection by confocal microscopy. At very early times postinfection (5 min) most of the virus was not internalized yet and appeared attached to the cell membrane. After 15 min, virus was observed inside the cell, and the viral fluorescence colocalized ($16.6\% \pm 2\%$) with that of early endosomes positive for EEA1 (Fig. 2D, circles). The percentage of early endosomes containing SVDV was reduced with the infection progress (45 min), indicating particle translocation to a different cell compartment (Fig. 2E). SVDV particles also colocalized with TF ($18\% \pm 6\%$) (Fig. 2F, circles), and endosomes loaded with SVDV could be observed close to microtubules (Fig. 2F, arrowheads). Often, these microtubule-asso-

ciated endosomes were negative for TF. Taken together, these results suggest that SVDV-productive infection requires transit through acidic endosomes for penetration.

Differential cytoskeleton requirements for intracellular sorting of SVDV, VSV, and FMDV. A pre-early endosome sorting that begins at the CCP, segregating cargo into two different early endosome populations has been recently described (43). One population corresponds to static and not microtubule-associated endosomes, while in the other the endosomes are dynamic and highly mobile along microtubules containing ligands that are directed preferentially to late endosomes/lysosomes. The proximity of SVDV particles to microtubules observed at early infection times (Fig. 2F) prompted us to study the requirement of intact microtubules for virus infection. When added preinfection (Fig. 3A), the microtubule-disrupting agent nocodazole reduced VSV and SVDV infection by 60%, while, as reported (8), it did not affect FMDV infection. When nocodazole was added postinfection, SVDV titers were not reduced, suggesting that microtubules play an important role at an early infection stage. Conversely, VSV infection was reduced at a level similar to that when the drug was added postinfection, indicating that VSV can be affected by microtubule disruption at later infection stages; this is likely due to the dependence on an intact secretory pathway for VSV infection progress (21, 51, 68). In fact, microtubule depolymerization induced by nocodazole (Fig. 3B) also caused Golgi fragmentation as estimated by immunostaining of the *cis*-Golgi marker gp74, which was dispersed in nocodazole treated cells.

Disruption of actin cytoskeleton with Cyt D (which was maintained throughout the assay to avoid cellular recovery) did not induce any significant effect on VSV, SVDV, or FMDV infection (Fig. 3C). As expected, this compound resulted in actin depolymerization (Fig. 3D). These results indicate a dependence on microtubule integrity for SVDV but not for FMDV internalization. On the other hand, disruption of actin cytoskeleton does not affect the infection of any of these three viruses.

Dynamin and differential signaling events are required for SVDV, VSV, and FMDV infection. Dynamin is a GTPase involved in several types of endocytosis, including the clathrin-mediated pathway. Preinfection treatment with dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin function (42, 49), inhibited the virus yield recovered upon infection of SVDV and FMDV (Fig. 4A). When added postinfection, dynasore did not inhibit SVDV and FMDV infection, indicating the requirement for dynamin is present at an early step of infection. As previously reported (36), dynasore inhibited VSV infection when added preinfection. Our results show that when added postinfection dynasore also inhibited virus growth, possibly due to effects on intracellular vesicle traffic dependent on dynamin, as vesicle formation from the Golgi (31, 40). The requirement for an intact secretory pathway in VSV infection has been reported (21, 51, 68).

Internalization and intracellular trafficking are governed by complex signaling events, including a galaxy of cellular kinases and phosphatases (65). We next addressed the effect of different inhibitors on the infection of the viruses studied. Bis, an inhibitor of protein kinase C (PKC) (66), did not inhibit significantly virus entry or infection (Fig. 4B). On the other hand,

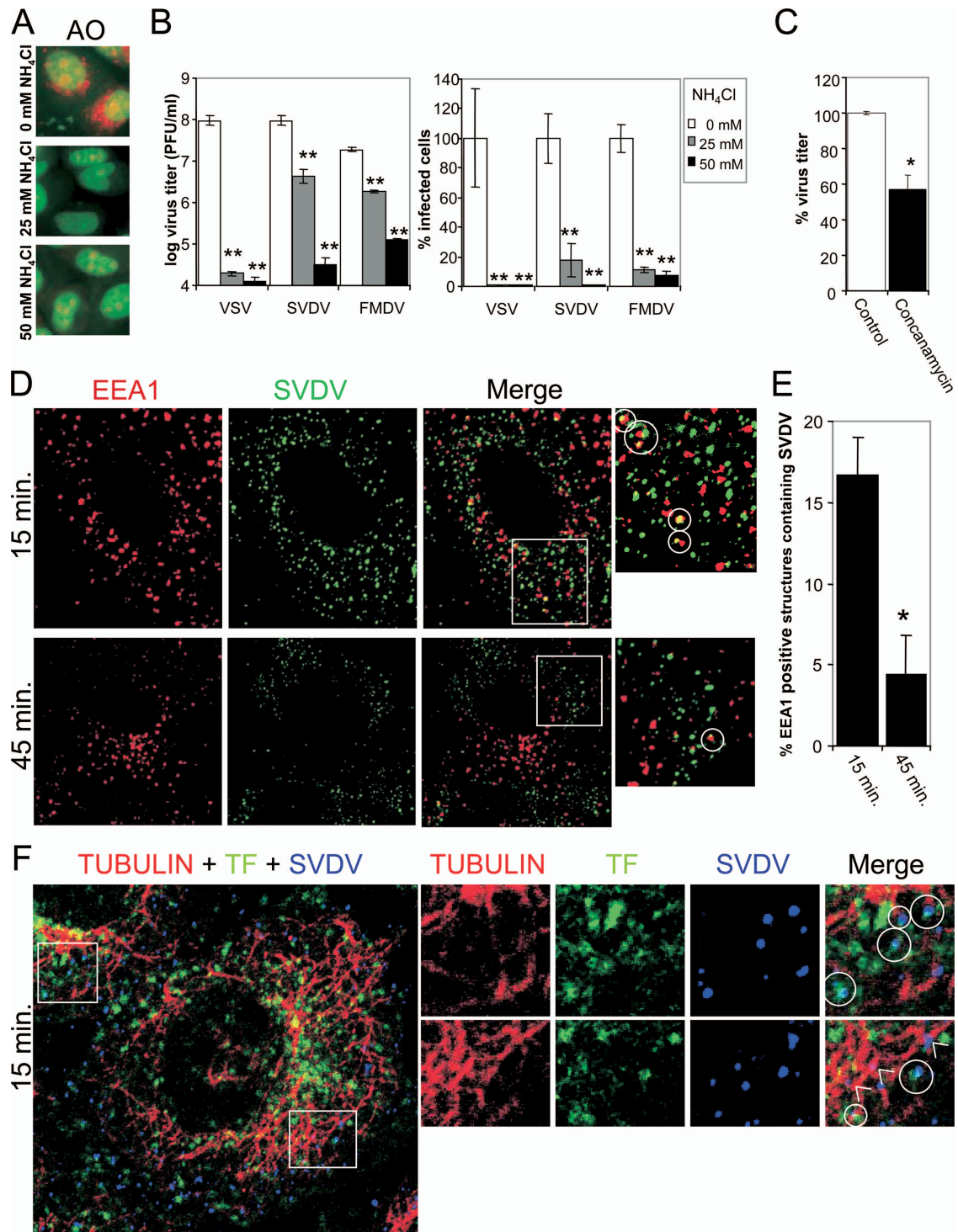


FIG. 2. Dependence on acidic endosomes for virus penetration. (A) Evaluation of treatment with increasing NH₄Cl concentrations on acidic intracellular compartments by AO vital staining. AO stains in red acidic organelles and nuclei in green. (B) Effects of pretreatment with different concentrations of NH₄Cl (0, 25, or 50 mM) on virus infection analyzed by plaque assay and by determination of the percentage of infected cells in immunofluorescence studies using I1, 2H12, and 5C4 antibodies to detect VSV, SVDV, and FMDV, respectively. Appropriate secondary antibodies coupled to Alexa Fluor 488 were used for detection of virus-specific antibodies. (C) Effects of pretreatment with concanamycin A on SVDV infection studied by plaque assay. (D) Colocalization assay of SVDV with the early endosomes marker EEA1. Cells were infected with SVDV (MOI of 100) for 1 h on ice and then transferred to 37°C 15 or 45 min, fixed, and processed for immunofluorescence using a mouse MAb to stain EEA1 (red) and a rabbit polyclonal antiserum to detect SVDV VP1 (green). Colocalization is shown in yellow (circles). Anti-mouse IgG secondary antibodies labeled with Alexa Fluor 594 and anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488-coupled secondary antibodies were used to detect primary antibodies. (E) Quantification of colocalization between EEA1 and SVDV. (F) Colocalization assays of SVDV with TF and microtubules. Cells were infected as in panel D in combination with TF for 1 h on ice, transferred to 37°C 15 min, fixed, and processed for immunofluorescence using a rabbit polyclonal antiserum against SVDV VP1 and a mouse MAb against tubulin. Anti-mouse Alexa Fluor 555-labeled and anti-rabbit Alexa Fluor 647-labeled secondary antibodies were used. Alexa Fluor 488-labeled TF is shown in green, tubulin is shown in red, and SVDV is shown in blue. Colocalization between blue and green appears in aqua (circles) in the merged image. Arrowheads point to SVDV loaded endosomes in close association with microtubules. Statistically significant differences between control and drug treatments are indicated by one asterisk ($P < 0.05$) or two asterisks ($P < 0.005$).

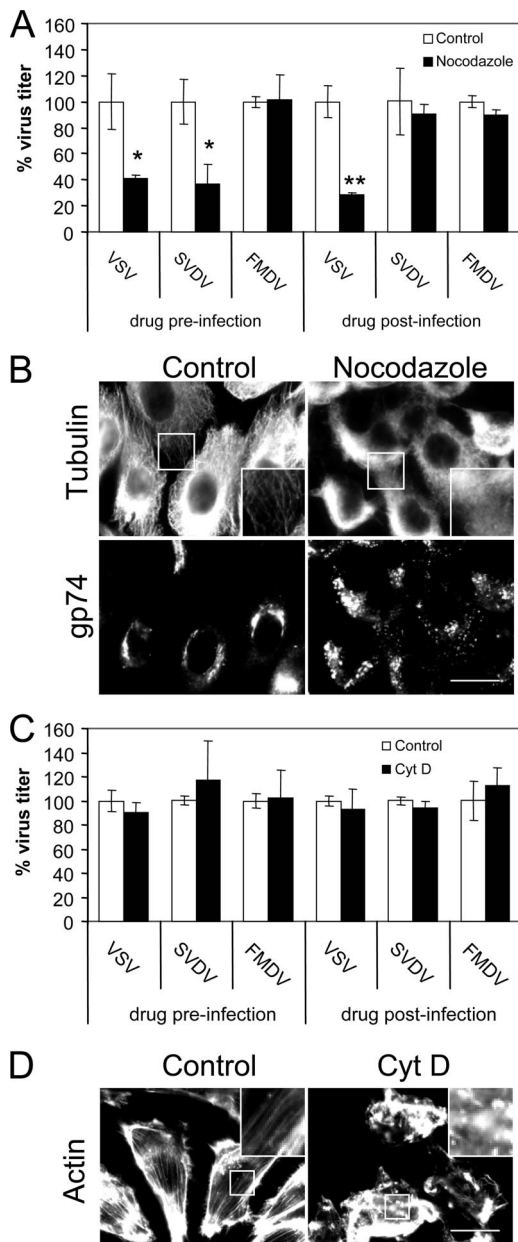


FIG. 3. Differential cytoskeleton requirements for intracellular sorting of viruses. (A) Effects of nocodazole on VSV, SVDV, and FMDV infection studied by plaque assay. (B) Evaluation of nocodazole treatment on microtubule and Golgi integrity. Cells treated or not with nocodazole were fixed and processed for immunofluorescence using rabbit polyclonal antiserum against tubulin and MAb 25H8 against *cis*-Golgi protein gp74. Anti-rabbit Alexa Fluor 488-coupled and anti-mouse Alexa Fluor 594-coupled secondary antibodies were used. Bar, 20 μ m. (C) Effects of Cyt D on virus infection studied by plaque assay. (D) Evaluation of Cyt D treatment on actin cytoskeleton integrity. Cells treated or not with Cyt D were fixed and processed for immunofluorescence using Alexa Fluor 488-labeled phalloidin to stain the cellular actin. Bar, 20 μ m. Statistically significant differences between control and drug treatments are indicated by one asterisk ($P < 0.05$) or two asterisks ($P < 0.005$).

inhibition of SVDV infection by the tyrosine phosphatase inhibitor OV (66) was higher for SVDV than for FMDV and VSV when OV was added preinfection (Fig. 4C). However, OV also inhibited SVDV replication when added postinfection,

supporting the possibility that the differential dependence on tyrosine phosphates was mainly due to postinternalization events. In the case of VSV and FMDV, OV only reduced virus infection when added preinfection, indicating that this drug affected virus entry of these two viruses. The nonspecific tyrosine kinase inhibitor genistein (15, 66) inhibited infection of VSV and SVDV, but not of FMDV, when added pre- and postinfection (Fig. 4D). This indicates that the inhibitory effect of this drug may be related to inhibition of virus replication rather than virus entry. The specific inhibitor of SRC-family tyrosine kinases PP2 (15), inhibited VSV, SVDV, and FMDV when added preinfection but not postinfection, suggesting that SRC kinases were involved at an early infection step (Fig. 5E).

Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinases with wortmannin prevents or delays ligand transfer from early to late endosomes (14). Preinfection treatment with wortmannin neither inhibited VSV and FMDV infection, as reported (8, 45), nor did it affect SVDV yields in IBRS-2 cells (Fig. 4F). This lack of effect was also observed when the drug was added postinfection. SVDV growth kinetics in the presence of wortmannin was also analyzed by plaque assay, revealing no delay in virus multiplication (data not shown). These results indicate that while dynamin is required for SVDV, VSV, and FMDV infection, differences exist in the signaling events that mediate the entry of these three viruses.

Differential cholesterol requirement for VSV, SVDV, and FMDV internalization. Cholesterol is important for lipid-raft and caveola function and has also been implicated in clathrin-mediated endocytosis (69, 83). Plasma membrane cholesterol depletion induced by M β CD inhibits lipid-raft/caveola-dependent virus infection (66) and can also affect infection of viruses using clathrin-mediated endocytosis (52, 79, 86). In addition, cholesterol plays an important role for the endosomal penetration of different viruses (20, 32). To evaluate the role of cholesterol in the early infection steps of the viruses compared, we treated IBRS-2 cells with M β CD. As estimated by filipin staining, this drug extracted cholesterol from plasma membrane ($40\% \pm 19\%$ reduction in filipin staining intensity), leaving the intracellular cholesterol content intact (no reduction of filipin staining) (Fig. 5A). Treatment with α CD, a cyclodextrin that does not significantly extract cholesterol from plasma membrane (74), did not reduce filipin staining intensity.

Preinfection treatment with M β CD differentially affected virus infection (Fig. 5B). Although the VSV yield was not significantly modified, the SVDV and FMDV titers were reduced 80 and 25%, respectively, and these results correlated with the percentage of infected cells. When the drug was added postinfection, no effect was observed, confirming that M β CD affected an early step of infection (Fig. 5B). Preinfection treatment with α CD did not have any significant effect on VSV, SVDV, and FMDV infection (Fig. 5C), supporting that the inhibitory effect of M β CD was due to cholesterol depletion and not to other effects derived from the addition of a cyclodextrin.

As M β CD can inhibit virus infection through caveolae, we investigated the ability of these viruses to induce caveolin-1 phosphorylation on Tyr 14, an essential event reported for CVB3 caveola-mediated endocytosis (15) and caveola internalization (23). None of the virus tested induced caveolin-1 phos-

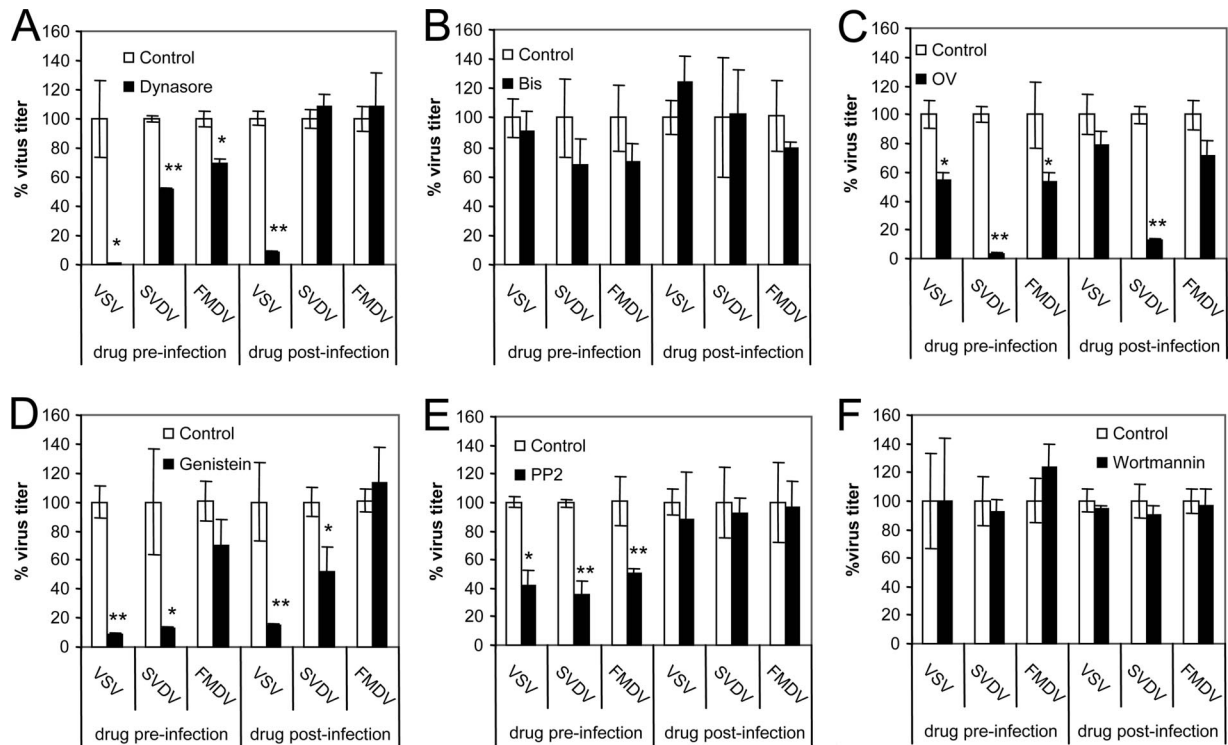


FIG. 4. Dynamin and cell signaling requirements for virus infection. The effects of dynasore (A), Bis (B), OV (C), genistein (D), PP2 (E), and wortmannin (F) on VSV, SVDV, and FMDV infection were studied by plaque assay. The following treatments induced measurable reported effects: dynasore, inhibition of TF internalization (49); wortmannin, endosomal vacuolation (46); and OV, tyrosine phosphorylation (73). Statistically significant differences between control and drug treatments are indicated by one asterisk ($P < 0.05$) or two asterisks ($P < 0.005$).

phorylation (Fig. 5D). The only positive signal was obtained in IBRS-2 cells treated with the tyrosine phosphatase inhibitor OV, whose addition results in caveolin-1 phosphorylation (73), used here as a control of the antibody used for detection of phosphorylated caveolin-1. In addition, treatment with nystatin, filipin, or lovastatin, which impair lipid-raft/caveola-mediated endocytosis (15, 85), did not inhibit SVDV or, as reported (52), VSV and FMDV infection (data not shown). These findings suggest that the role of cholesterol in SVDV and FMDV internalization is independent of caveolae.

DISCUSSION

In this study we have attempted a sequential and comparative analysis of the entry events of three important animal viruses by using drugs inhibiting different components of cell machinery involved in viral entry. A summary of the effects on SVDV, FMDV, and VSV entry of the drugs tested for all three viruses is shown in Table 1. Our results indicate that the SVDV isolate used here, which binds CAR but not DAF (34) and is able to interact with HS (26), is internalized through dynamin-dependent, clathrin-mediated endocytosis and transported to early endosomes, as indicated by its colocalization with EEA1 and TF. Infection requires endosomal acidification, as revealed by the inhibitory effect of NH_4Cl and concanamycin A. Interestingly, infection inhibition by concanamycin A was different from that observed for NH_4Cl . Previous work using FMDV indicated that NH_4Cl block of endosomal acidification caused a higher reduction of virus infection than concanamycin A

treatment (52). This may be explained by the different conditions of NH_4Cl and concanamycin treatments; while NH_4Cl was present throughout the infection, concanamycin was removed after the first infection hour. However, the effect of concanamycin A, in contrast to that observed for NH_4Cl , is not readily reversible (57, 62). Another differential factor is that NH_4Cl blockage of endosomal acidification is produced by neutralization of endosomal pH, whereas concanamycin inhibits the proton flux into the endosome but does not neutralize remaining acid pH within the endosomes.

Macropinocytosis has been implicated in coxsackievirus entry (16). Our results indicate that SVDV, FMDV, and VSV infections depend on dynamin but not on PKC function (Fig. 4B) and actin cytoskeleton integrity (Fig. 3C), two of the important features of macropinocytosis (3, 16), suggesting that this route is not exploited by any of the viruses studied.

Interestingly, comparison of the SVDV internalization events to those of VSV and FMDV suggests diversity in the endosomal pathways that can be exploited by these three animal viruses that use clathrin to enter cells. It has been recently reported that FMDV mutants using HS as a receptor can be internalized via caveolae in contrast to FMDV isolates interacting with integrins, whose internalization is dependent on clathrin (60). The C-S8c1 isolate used in this study does not bind HS (6), ruling out this possibility (see Materials and Methods).

Differential endocytosis requirements included sensitivity to plasma membrane cholesterol depletion with M β CD, which

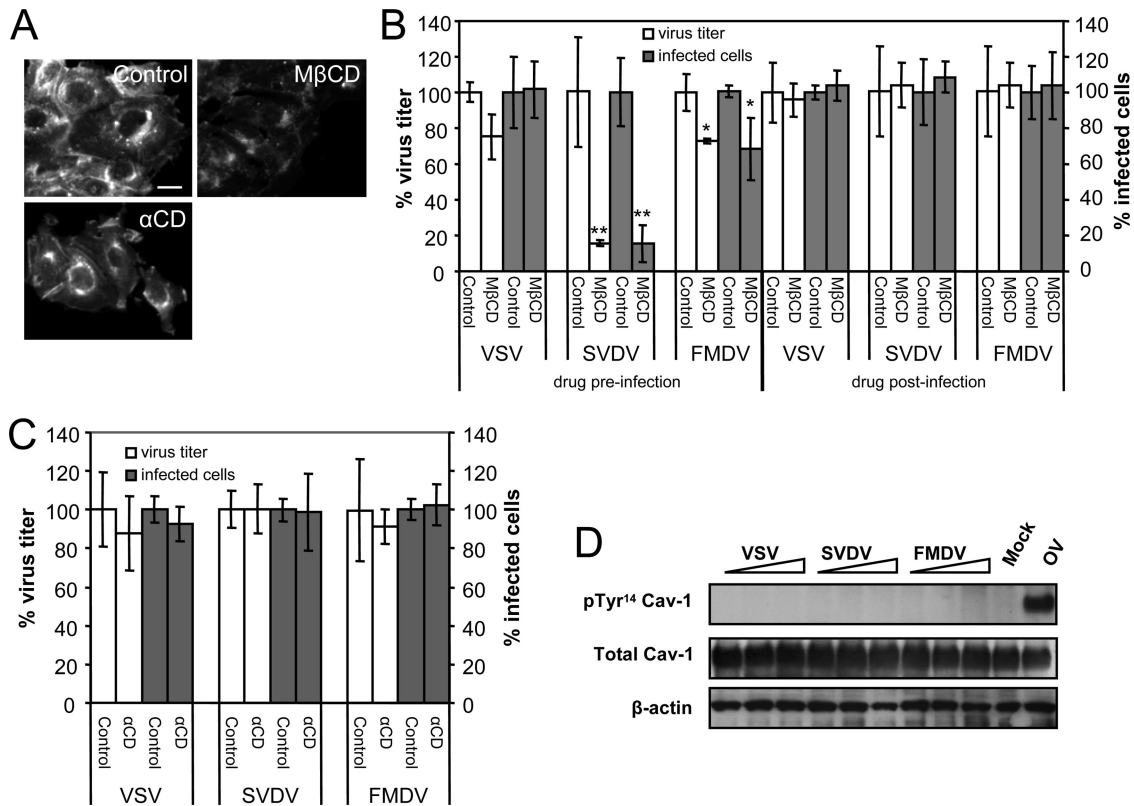


FIG. 5. Differential requirements for cholesterol in virus infection. (A) Effects of MβCD and αCD on cellular cholesterol content of IBRS-2 cells studied by filipin staining. Bar, 20 μm. (B) Effect of cholesterol depletion by MβCD on virus infection evaluated by plaque assay and the percentage of infected cells in immunofluorescence studies using I1, 2H12, and 5C4 antibodies to detect VSV, SVDV, and FMDV, respectively, and appropriate secondary antibodies coupled to Alexa Fluor 488. (C) Effects of treatment with αCD on virus infection. (D) VSV, SVDV, and FMDV infections do not induce caveolin-1 phosphorylation on Tyr14. IBRS-2 cells were infected (MOI of 100) for 1 h on ice and then incubated for 15, 30, or 60 min at 37°C; lysed; and processed for Western blotting using MAb anti-Tyr¹⁴ phosphorylated caveolin-1, and polyclonal serum to caveolin-1 to detect total caveolin-1. An extract of IBRS-2 cells treated with 1 mM OV 60 min was included as a control of MAb anti-Tyr¹⁴ phosphorylated caveolin-1. Results obtained with β-actin are also shown as a control for protein loading. Statistically significant differences between control and drug treatments are indicated by one asterisk ($P < 0.05$) or two asterisks ($P < 0.005$).

TABLE 1. Summary of effects on SVDV, FMDV, and VSV entry of the drugs tested^a

Cellular target	Drug	Virus ^b		
		SVDV	FMDV	VSV
Dynamain	Dynasore	+	+	+PI
Endosomal pH	NH ₄ Cl	+	+	+
Microtubules	Nocodazole	+	-	+PI
Actin microfilaments	Cyt D	-	-	-
Cell signaling machinery	OV	+PI	+	+
	Genistein	+PI	+	+PI
	PP2	+	+	+
	Bis	-	-	-
	Wortmannin	-	-	-
	Cholesterol	MβCD	+	+
	Filipin	-	-	-
	Lovastatin	-	-	-
	Nystatin	-	-	-

^a Only drugs for which results with the three viruses compared were obtained are included.

^b +, Statistically significant inhibitory effect of the drug on virus infection only when added preinfection; +PI, the drug also had a statistically significant inhibitory effect when added postinfection; -, no statistically significant effect when added pre- or postinfection.

was higher for SVDV than for FMDV and not significant in the case of VSV. This SVDV and FMDV cholesterol requirement was independent of caveolin-1 phosphorylation, and more specific drugs affecting the caveolin pathway (nystatin, filipin, and lovastatin) did not affect virus infection, suggesting that the cholesterol requirement observed is not related to caveola function. These results could be explained by an altered location of virus receptors on plasma membrane microdomains in MβCD-treated cells (52). Supporting this hypothesis, CAR has been shown to be associated to lipid-rafts distinct from those containing caveolin-1 and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins (5), and infection by type 2 adenovirus, a virus internalized by clathrin-mediated endocytosis that uses CAR as a cellular receptor, is inhibited by MβCD (32). However, we cannot exclude that the different cholesterol requirements of the three viruses studied could be due to distinct endosomal escape mechanisms resulting in viral penetration, since cholesterol can play a key role in endosomal escape of different viruses, and this can be affected by cholesterol extraction with MβCD (20, 32).

Because CCPs were first associated with VSV endocytosis in a process named viropexis (78), the role of clathrin and asso-

ciated proteins in viral infection has been widely investigated. Internalization of ligands by clathrin CCPs has been proposed to rely on different signaling events (89). Indeed, genistein, a tyrosine kinase inhibitor, can differentially affect clathrin-mediated internalization of ligands (44). The differences found in our experiments in the sensitivity of the viruses studied to OV (phosphatase inhibitor) and genistein (kinase inhibitor) support this notion of signaling diversity. The ability of these two molecules producing opposite effects on Tyr phosphorylation to inhibit viral infection has been also reported for echovirus (66). These observations may be explained because the signaling events driving ligand internalization are very complex and requires both regulated phosphorylation and dephosphorylation of cellular components.

Different populations of CCPs with specific adaptor proteins have been identified (35, 41, 67). Lakadamyali et al. (43) showed by means of live cell imaging that ligands for clathrin-mediated endocytosis can be sorted, in a process that begins at CCP, into two populations of early endosomes that show different microtubule-mediated mobility. Our results, obtained from the effect of different drugs on viral infection, support this specialized cargo sorting into distinct endosome populations. Treatment with nocodazole showed that SVDV may be internalized to dynamic endosomes in contrast to FMDV. VSV dependence on microtubules for intracellular sorting has been previously described (46), suggesting that it is sorted into the dynamic endosome population, although it may infect from early and late endosomes (46, 76). Since TF traffics through early and recycling endosomes but not to late endosomes (43), the observation of SVDV particles close to microtubules but not associated to TF (Fig. 2F) suggests that SVDV can be sorted to a different cell compartment in a microtubule-dependent way. These results could be explained by the possibility of SVDV and VSV (but not FMDV) being transported to late endosomes/lysosomes for productive infection. However, this possibility was ruled out because of the lack of inhibition by wortmannin, a drug that inhibits early to late endosome transport, and by Bis, an inhibitor of PKC function that has been implicated in early to late endosome viral transport (8, 10, 17, 75).

Taken together, these results indicate that SVDV and VSV are sorted to a distinct population of early endosomes different from FMDV. This pre-early endosome sorting process may begin at plasma membrane CCP as reported for other ligands (43), thus segregating cargo into different CCP populations as a mechanism to reduce competition between diverse endocytic cargo (67). A better understanding of this emerging complexity will aid in the design of new antiviral compounds targeting the clathrin-mediated endocytosis machinery of host cells.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank V. Ley and M. A. Jiménez-Clavero for providing SVDV isolate SPA/1/93 and with serum to SVDV VP1, M. Dávila and E. Domingo for VSV Indiana isolate and MAb II, I. Sandoval for MAb 25H8, E. Brocchi for MAb 2H12, and M. T. Rejas for advice in the TEM studies. Dynasore was synthesized by H. E. Pelish and was kindly provided by T. Kirchhausen.

This study was supported by Spanish grants from CICYT (Bio2008-04487-C03-01) and MEC (CSD2006-0007) and by the Fundación Severo Ochoa.

REFERENCES

- Alcalde, J., G. Egea, and I. V. Sandoval. 1994. gp74 a membrane glycoprotein of the cis-Golgi network that cycles through the endoplasmic reticulum and intermediate compartment. *J. Cell Biol.* **124**:649–665.
- Alexandersen, S., and N. Mowat. 2005. Foot-and-mouth disease: host range and pathogenesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **288**:9–42.
- Amstutz, B., M. Gastaldelli, S. Kalin, N. Imelli, K. Boucke, E. Wandeler, J. Mercer, S. Hemmi, and U. F. Greber. 2008. Subversion of CtBP1-controlled macropinocytosis by human adenovirus serotype 3. *EMBO J.* **27**:956–964.
- Armas-Portela, R., M. A. Parrales, J. P. Albar, A. C. Martinez, and J. Avila. 1999. Distribution and characteristics of betaII tubulin-enriched microtubules in interphase cells. *Exp. Cell Res.* **248**:372–380.
- Ashbourne Excoffon, K. J., T. Moninger, and J. Zabner. 2003. The coxsackie B virus and adenovirus receptor resides in a distinct membrane microdomain. *J. Virol.* **77**:2559–2567.
- Baranowski, E., N. Sevilla, N. Verdaguier, C. M. Ruiz-Jarabo, E. Beck, and E. Domingo. 1998. Multiple virulence determinants of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *J. Virol.* **72**:6362–6372.
- Benmerah, A., and C. Lamaze. 2007. Clathrin-coated pits: vive la difference? *Traffic* **8**:970–982.
- Berryman, S., S. Clark, P. Monaghan, and T. Jackson. 2005. Early events in integrin α v β 6-mediated cell entry of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* **79**:8519–8534.
- Borrego, B., E. Carra, J. A. Garcia-Ranea, and E. Brocchi. 2002. Characterization of neutralization sites on the circulating variant of swine vesicular disease virus (SVDV): a new site is shared by SVDV and the related coxsackie B5 virus. *J. Gen. Virol.* **83**:35–44.
- Brabec, M., D. Blaas, and R. Fuchs. 2006. Wortmannin delays transfer of human rhinovirus serotype 2 to late endocytic compartments. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **348**:741–749.
- Brandenburg, B., L. Y. Lee, M. Lakadamyali, M. J. Rust, X. Zhuang, and J. M. Hogle. 2007. Imaging poliovirus entry in live cells. *PLoS Biol.* **5**:e183.
- Burman, A., S. Clark, N. G. Abrescia, E. E. Fry, D. I. Stuart, and T. Jackson. 2006. Specificity of the VP1 GH loop of foot-and-mouth disease virus for α v integrins. *J. Virol.* **80**:9798–9810.
- Coil, D. A., and A. D. Miller. 2004. Phosphatidylserine is not the cell surface receptor for vesicular stomatitis virus. *J. Virol.* **78**:10920–10926.
- Corvera, S. 2001. Phosphatidylinositol 3-kinase and the control of endosome dynamics: new players defined by structural motifs. *Traffic* **2**:859–866.
- Coyne, C. B., and J. M. Bergelson. 2006. Virus-induced Abl and Fyn kinase signals permit coxsackievirus entry through epithelial tight junctions. *Cell* **124**:119–131.
- Coyne, C. B., L. Shen, J. R. Turner, and J. M. Bergelson. 2007. Coxsackievirus entry across epithelial tight junctions requires occludin and the small GTPases Rab34 and Rab5. *Cell Host Microbe* **2**:181–192.
- Chu, J. J., P. W. Leong, and M. L. Ng. 2006. Analysis of the endocytic pathway mediating the infectious entry of mosquito-borne flavivirus West Nile into *Aedes albopictus* mosquito (C6/36) cells. *Virology* **349**:463–475.
- Chung, S. K., J. Y. Kim, I. B. Kim, S. I. Park, K. H. Paek, and J. H. Nam. 2005. Internalization and trafficking mechanisms of coxsackievirus B3 in HeLa cells. *Virology* **333**:31–40.
- Damm, E. M., and L. Pelkmans. 2006. Systems biology of virus entry in mammalian cells. *Cell Microbiol.* **8**:1219–1227.
- Danthi, P., and M. Chow. 2004. Cholesterol removal by methyl-beta-cyclodextrin inhibits poliovirus entry. *J. Virol.* **78**:33–41.
- Das, S. C., D. Nayak, Y. Zhou, and A. K. Pattnaik. 2006. Visualization of intracellular transport of vesicular stomatitis virus nucleocapsids in living cells. *J. Virol.* **80**:6368–6377.
- De Castro, M. P. 1964. Behaviour of the foot-and-mouth disease virus in cell cultures: susceptibility of the IB-RS-2 cell line. *Arq. Inst. Biol. Sao Paulo* **31**:63–78.
- del Pozo, M. A., N. Balasubramanian, N. B. Alderson, W. B. Kiosses, A. Grande-García, R. G. Anderson, and M. A. Schwartz. 2005. Phospho-caveolin-1 mediates integrin-regulated membrane domain internalization. *Nat. Cell Biol.* **7**:901–908.
- DeTulleo, L., and T. Kirchhausen. 1998. The clathrin endocytic pathway in viral infection. *EMBO J.* **17**:4585–4593.
- Drose, S., and K. Altendorf. 1997. Bafilomycins and concanamycins as inhibitors of V-ATPases and P-ATPases. *J. Exp. Biol.* **200**:1–8.
- Escribano-Romero, E., M. A. Jimenez-Clavero, P. Gomes, J. A. Garcia-Ranea, and V. Ley. 2004. Heparan sulphate mediates swine vesicular disease virus attachment to the host cell. *J. Gen. Virol.* **85**:653–663.
- Fry, E. E., N. J. Knowles, J. W. Newman, G. Wilsden, Z. Rao, A. M. King, and D. I. Stuart. 2003. Crystal structure of Swine vesicular disease virus and implications for host adaptation. *J. Virol.* **77**:5475–5486.
- García-Briones, M., M. F. Rosas, M. González-Magaldi, M. A. Martín-Acebes, F. Sobrino, and R. Armas-Portela. 2006. Differential distribution of nonstructural proteins of foot-and-mouth disease virus in BHK-21 cells. *Virology* **349**:409–421.
- Hanover, J. A., M. C. Willingham, and I. Pastan. 1984. Kinetics of transit of

- Baranowski, and V. Ley.** 2001. Foot-and-mouth disease virus: a long known virus, but a current threat. *Vet. Res.* **32**:1–30.
83. **Subtil, A., I. Gaidarov, K. Kobylarz, M. A. Lampson, J. H. Keen, and T. E. McGraw.** 1999. Acute cholesterol depletion inhibits clathrin-coated pit budding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:6775–6780.
84. **Sun, X., V. K. Yau, B. J. Briggs, and G. R. Whittaker.** 2005. Role of clathrin-mediated endocytosis during vesicular stomatitis virus entry into host cells. *Virology* **338**:53–60.
85. **Triantafilou, K., and M. Triantafilou.** 2004. Lipid-raft-dependent coxsackievirus B4 internalization and rapid targeting to the Golgi. *Virology* **326**:6–19.
86. **Vela, E. M., L. Zhang, T. M. Colpitts, R. A. Davey, and J. F. Aronson.** 2007. Arenavirus entry occurs through a cholesterol-dependent, non-caveolar, clathrin-mediated endocytic mechanism. *Virology* **369**:1–11.
87. **Verdaguer, N., M. A. Jimenez-Clavero, I. Fita, and V. Ley.** 2003. Structure of swine vesicular disease virus: mapping of changes occurring during adaptation of human coxsackie B5 virus to infect swine. *J. Virol.* **77**:9780–9789.
88. **Wang, L. H., K. G. Rothberg, and R. G. Anderson.** 1993. Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. *J. Cell Biol.* **123**:1107–1117.
89. **Warren, R. A., F. A. Green, P. E. Stenberg, and C. A. Enns.** 1998. Distinct saturable pathways for the endocytosis of different tyrosine motifs. *J. Biol. Chem.* **273**:17056–17063.
90. **Zautner, A. E., B. Jahn, E. Hammerschmidt, P. Wutzler, and M. Schmidtke.** 2006. N- and 6-O-sulfated heparan sulfates mediate internalization of coxsackievirus B3 variant PD into CHO-K1 cells. *J. Virol.* **80**:6629–6636.
91. **Zhang, G., D. T. Haydon, N. J. Knowles, and J. W. McCauley.** 1999. Molecular evolution of swine vesicular disease virus. *J. Gen. Virol.* **80**(Pt. 3):639–651.