

2
29

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

**UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y DE
POSGRADO**

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

CONTENIDO

1. RESUMEN

2. ANTECEDENTES

3. RESULTADOS.

a. Artículo. Journal of Virology.

b. Resultados adicionales

4 DISCUSION

5. APENDICE

6. REFERENCIAS.

SUMMARY

Rotaviruses are the principal cause of gastroenteritis in many animal species, including humans. Animal and human rotaviruses differ in their requirements to infect cultured cells: animal strains require the presence of sialic acid residues on the surface of the cells while human strains do not. Treatment of the cells with neuraminidases or incubation of animal rotavirus with some sialoglycoproteins, like glycophorin A (gphA), greatly reduces virus infectivity. In order to understand the initial stages of infection, virus variants were isolated. The infectivity of these variants, named nar and gpr, is no longer dependent on the presence of sialic acid on the cell surface since it is resistant to neuraminidase treatment and the presence of gphA. In addition, although these variants still bind to gphA as efficiently as the wild type virus, this interaction no longer inhibits the virus infection. These observations indicate that the initial interaction of the mutants with the cell is through a site different from the sialic acid binding site located on VP8. The mutant phenotype segregates with the VP4 gene. Although the monoclonal antibodies directed to VP8 were able to bind to the mutants, they showed little or no neutralizing activity.

The mutants are able to infect several cell lines treated with neuraminidase; in contrast, animal strains of rotavirus show different susceptibility to the neuraminidase treatment depending of the cell line; apparently, this susceptibility is also dependent of the VP4 gene. The infectivity of a human strain increased considerably on neuraminidase treated cells.

RESUMEN.

Los rotavirus constituyen el agente etiológico más importante de gastroenteritis en niños menores de dos años, produciendo diarrea severa con la consecuente deshidratación y, en casos extremos, la muerte; también son responsables de gastroenteritis en animales jóvenes de varias especies, incluyendo algunas de importancia económica para el hombre.

Los rotavirus de origen animal, pero no los de origen humano, aglutinan eritrocitos de diversas especies; esta interacción con el eritrocito depende de la presencia de ácidos siálicos sobre la membrana. Asimismo, los residuos de ácidos siálicos se requieren para la infección de la célula huésped con rotavirus animales, pero no para la infección con rotavirus humanos. La infectividad de los rotavirus animales también es inhibida tanto *in vitro* como *in vivo* por la presencia de sialoglicoproteínas como mucina y glicoforina A

El presente trabajo tuvo por objetivo conocer más acerca del mecanismo por el que los rotavirus se adsorben y penetran a la célula huésped. La estrategia utilizada consistió en seleccionar y caracterizar variantes de rotavirus de origen animal cuya infectividad, a diferencia del virus silvestre, fuera resistente al tratamiento de las células con neuraminidasas ó a la presencia de una proteína con alto contenido de ácidos siálicos, como la glicoforina A (gphA), que ha sido identificada como el receptor de rotavirus en el eritrocito. El estudio de estas variantes sería de utilidad para conocer algunos aspectos involucrados en la adsorción y penetración de los rotavirus.

Se obtuvieron variantes de rotavirus de origen animal que no requieren de residuos de ácido siálico para infectar a su célula huésped (denominadas nar y gpr), ya que son resistentes al tratamiento de éstas con neuraminidasas; a pesar de este comportamiento, mantienen su capacidad para unirse a ácidos siálicos ya que hemaglutinan de la misma manera que lo hace el virus padre y esta hemaglutinación se inhibe por el tratamiento de los eritrocitos con neuraminidasa y por la presencia de gphA, a concentraciones similares a las que inhiben al virus silvestre. La proteína VP4 es responsable de este fenotipo.

Todos los Mabs que reaccionan con VP8, en diferentes epítopes, mantienen su reactividad con estas variantes, por lo que el dominio de hemaglutinación en VP4 (localizado entre los aminoácidos 47-247), parece estar conservado, con respecto al virus silvestre. Por otro lado, a pesar de que las variantes nar y gpr se unen a gphA, son capaces de infectar a la célula en su presencia, lo que no puede hacer el virus silvestre.

Así, al parecer, la caracterización de estas variantes ha permitido poner de manifiesto que los rotavirus animales pueden hemaglutinar y adsorberse a la célula huésped a través de diferentes dominios de VP4.

Las variantes nar y gpr tienen semejanzas con cepas de rotavirus animales y humanos. Por un lado, estas variantes mantienen su capacidad para aglutinar eritrocitos y unirse a siálicos, como las cepas animales; por otro lado, la infectividad de las variantes no se afecta por el tratamiento de las células con neuraminidasa ni por la presencia de gphA; además, anticuerpos que reconocen epítopes de VP8 no neutralizan a las variantes, como parece ocurrir entre las cepas humanas.

La infectividad de rotavirus de diversos orígenes en diferentes células tratadas con neuraminidasas es diferente a pesar de ser de origen común, por lo que existe la posibilidad de que los rotavirus animales reconozcan más de un sitio como sitio inicial de reconocimiento en la célula. Los residuos de ácidos siálicos parecen entorpecer la adsorción y/o penetración de los rotavirus humanos, ya que su infectividad se incrementa, hasta más de dos veces, en células tratadas con neuraminidasas.

A N T E C E D E N T E S .

Los rotavirus fueron descubiertos en 1973 por R. Bishop, a partir de biopsias duodenales provenientes de pacientes pediátricos hospitalizados por gastroenteritis no bacteriana (4). Desde entonces, este grupo de virus ha sido reconocido como el principal agente etiológico de gastroenteritis no bacteriana. Los rotavirus afectan principalmente niños menores de dos años, produciendo diarrea severa con la consecuente deshidratación y, en casos extremos, la muerte (8). Los rotavirus también son responsables de gastroenteritis en animales jóvenes de varias especies, incluyendo algunas de importancia económica para el hombre (21).

In vivo, la infección con rotavirus se restringe a las células epiteliales de las puntas de las vellosidades del intestino delgado (21); sin embargo, en cultivo, los rotavirus son capaces de infectar varias líneas celulares de origen epitelial provenientes de diversos tejidos. La mayoría de los estudios con rotavirus, que serán mencionados posteriormente, se han realizado en este tipo de células, específicamente en la línea celular de origen epitelial MA104, derivada de riñón de mono rhesus.

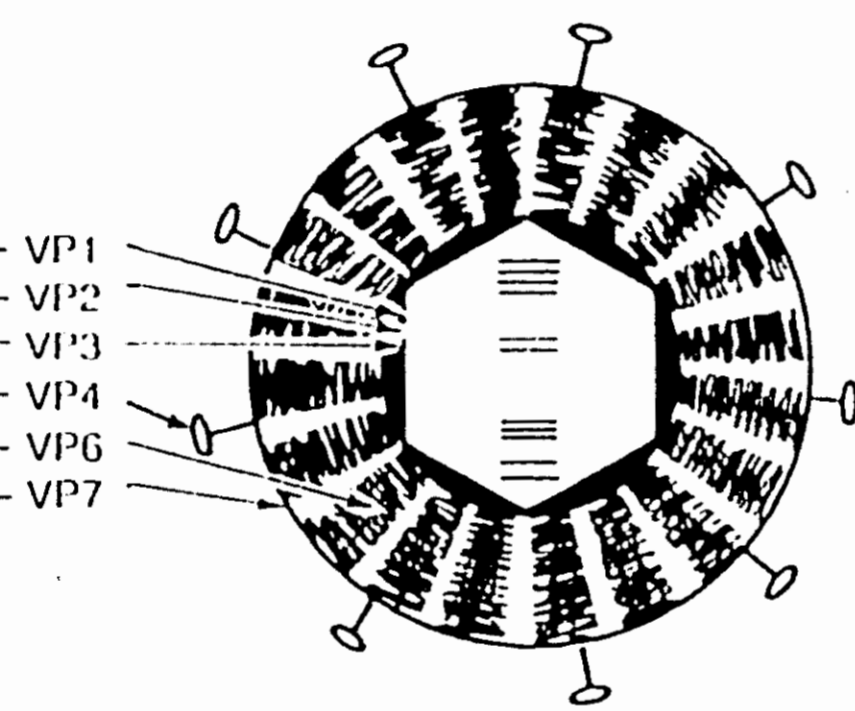
Las partículas de los rotavirus están constituidas por tres capas concéntricas de proteínas, dentro de las cuales se encuentra un genoma segmentado formado por 11 moléculas de RNA de doble cadena, cuyo tamaño varía de 650 a 3300 pb (10). Cada molécula de RNA representa un gene y codifica para una sola proteína (FIGURA 1).

Las proteínas que conforman el virión, denominadas proteínas estructurales, son: VP1, VP2 y VP3 que forman el núcleo del virus; VP6 que se encuentra formando la capa intermedia; y las proteínas VP4 y VP7 que constituyen la capa externa del virión (Figura 1). Al microscopio electrónico, los rotavirus presentan una estructura icosaédrica de la cual surgen proyecciones, denominadas peplómeros (43).

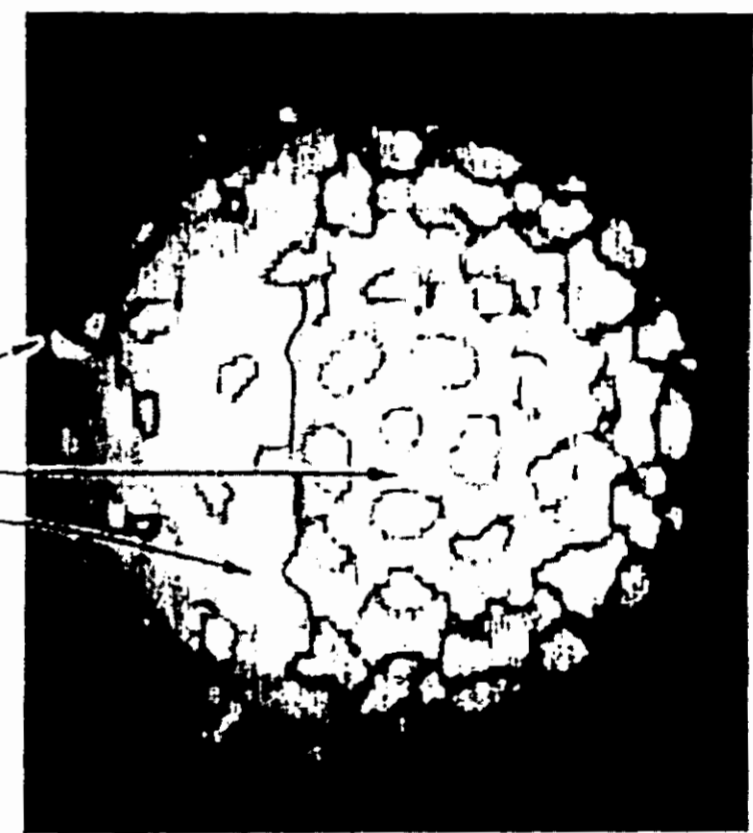
Durante la infección de una célula con rotavirus, se producen, además de las proteínas estructurales, proteínas virales que no se encuentran en el virión maduro. Estas proteínas se conocen como "no estructurales" (NS) y, de acuerdo al peso molecular aparente de cada una de ellas, se han denominado NS53 (producto del gene 5), NS35 y NS34 (productos de los genes 7, 8 ó 9, dependiendo de la cepa), NS28 (gene 10), y NS26 (gene 11). Las proteínas no estructurales tienen una función importante en los procesos

ds RNA Proteína

1	—	125,000	—
2	==	94,000	—
3	==		
4	—	88,000	—
		88,000	—
5	—	53,000	—
6	—		
7	==	41,000	—
8	==		
9	==	37,000	—
		35,000	—
10	—	34,000	—
		26,000	—
11	—	20,000	—



VP1
VP2
VP3
VP4
VP6
VP7



Capa externa | Capa interna

FIGURA 1. Representación esquemática de rotavirus, genoma y proteínas estructurales.

de replicación del genoma viral y de ensamblaje de las partículas virales durante la infección(10).

Las proteínas del núcleo viral, VP1, VP2 y VP3, parecen tener una función importante durante la transcripción del genoma viral. Algunas regiones de VP1 presentan similitud con ciertos motivos presentes en proteínas con actividad de RNA polimerasa RNA-dependientes, por lo que se piensa que VP1 tiene esta actividad en los rotavirus (37, 56). La proteína VP3, expresada en baculovirus, tiene actividad de guanililtransferasa *in vitro*, lo que la hace necesaria para la formación del CAP en el RNAm de rotavirus (28). La proteína VP2 no ha sido asociada, hasta ahora, con alguna actividad enzimática, pero se piensa que las tres proteínas del núcleo viral están involucradas con los procesos de replicación y transcripción del genoma viral, ya que todas ellas se encuentran presentes en partículas subvirales con estas actividades (15).

La proteína VP6 es la más abundante en el virión (51% del total de proteína), en el que se asocia en forma de trímeros (10). No se sabe la función exacta de VP6, pero su presencia es indispensable para que las partículas sin capa externa produzcan las moléculas de RNAm (actividad de transcriptasa); estas partículas pierden dicha actividad cuando VP6 se disocia de ellas y la recuperan cuando VP6 se les incorpora nuevamente (48). En esta proteína existen epítopes que se han utilizado para clasificar a los rotavirus en grupos y subgrupos (10).

Las proteínas que forman la capa externa de los rotavirus, VP4 y VP7, son necesarias para una infección productiva, ya que las partículas virales que carecen de ellas no son infecciosas. Debido a que éstas juegan un papel importante en las primeras interacciones del virus con la célula huésped durante la infección, se discutirán con mayor detalle.

La proteína VP7 es la más abundante de la capa externa, representando el 30% de la proteína total presente en el virión (10); ésta se procesa de manera postraduccional, liberando un péptido señal de 51 aminoácidos y glicosilándose con residuos de tipo "alta manosa" en retículo endoplásmico, sitio en donde se ensambla a la partícula viral (51, 52). Es codificada por el gene 7, 8 ó 9, dependiendo de la cepa de rotavirus (los genes se numeran en orden progresivo, de acuerdo a su migración electroforética). VP7 induce anticuerpos que neutralizan la infectividad del virus en cultivos celulares. Anticuerpos neutralizantes que reconocen epítopes de VP7 han sido utilizados para agrupar a los rotavirus en 14 distintos serotipos, varios de los cuales incluyen cepas aisladas de

humanos y de animales (10) (de aquí en adelante, me referiré a ellas como cepas humanas y animales, respectivamente)

Aunque no se sabe la función de VP7 durante los primeros estadios de la infección por rotavirus, algunos estudios sugieren que VP7 es la proteína por la que se lleva a cabo la adsorción del virus a la célula huésped (14, 47).

La proteína VP4, producto del gene 4, representa solamente el 1.5% de la proteína total en el virión maduro (10); estudios de criomicroscopía electrónica y reconstitución de imágenes, utilizando el virus acomplejado con Mabs* dirigidos contra VP4, sugieren que esta proteína se encuentra en la superficie del virión, como dímero, formando los peplómeros (60 en total) (42).

Cuando forma parte del virión, VP4 es susceptible de cortarse con tripsina produciendo dos polipéptidos con pesos moleculares aproximados de 28 (VP8) y 60 Kd (VP5), que representan los extremos amino y carboxilo de VP4, respectivamente (9, 30). El corte con tripsina se ha relacionado con un incremento en la infectividad de los rotavirus (11). Se ha determinado que el corte con tripsina ocurre en los aminoácidos Arg-241 y Arg-247 de VP4 (30); sin embargo, existe otro sitio susceptible a esta enzima, en el aminoácido Arg-231, que está totalmente conservado en todos los rotavirus. No se sabe cual(es) de los tres sitios susceptibles a tripsina es el responsable directo del incremento en la infectividad.

La infección simultánea de una célula con dos rotavirus diferentes, resulta en la producción de virus rearreglantes, que contienen una mezcla de genes, y por lo tanto de proteínas, provenientes de ambos padres. La generación de virus rearreglantes ha sido una herramienta muy utilizada en el campo de los rotavirus para el asignamiento génico y, cuando los virus padres poseen características diferentes, para definir las funciones de ciertas proteínas. De esta manera, se le han asignado a VP4 varias funciones, tales como la restricción de huésped, virulencia y hemaglutinación, entre otras.

La virulencia de los rotavirus reside en el gene 4, lo cual se demostró con virus rearreglantes que resultaron de la coinfección con dos cepas de rotavirus que tienen diferente grado de virulencia en ratón (39). Reforzando este concepto, se ha determinado que, entre cepas de rotavirus humano, existe mayor homología entre las VP4 aisladas de pacientes sintomáticos y que, a su vez, difieren de las VP4 de cepas aisladas de pacientes asintomáticos (16).

* Abreviaturas: Mabs. anticuerpos monoclonales; NA. neuraminidasa; gphA. glicoforina A; HA. hemaglutinación

Los rotavirus animales aglutinan eritrocitos de diversas especies, incluyendo eritrocitos humanos, mientras que los rotavirus de origen humano no lo hacen (13). Mediante el uso de virus rearreglantes, provenientes de cepas humanas y animales, se encontró que la proteína VP4 es responsable de la hemaglutinación (HA) (19). A través de la expresión de VP4 y porciones de ésta en sistemas heterólogos, como Baculovirus (12, 32) y *E. coli* (29), se ha demostrado que la región de VP4 directamente responsable de la hemaglutinación está localizada entre los aminoácidos 42 y 247 de la proteína, región que representa aproximadamente el 90% del polipéptido VP8, que resulta del corte proteolítico con tripsina.

La unión del virus con el eritrocito está mediada por la glicoforina A (gphA) (32); esta glicoproteína, una de las más abundantes en el eritrocito, es transmembranal con gran contenido de ácidos siálicos (70 aminoácidos, de los cuales 16 poseen oligosacáridos de tipo complejo), que son determinantes para la interacción del virus con el eritrocito, ya que el tratamiento de estas células con neuraminidasas, impiden la hemaglutinación (13).

La proteína VP4, al igual que VP7, induce anticuerpos que neutralizan la infectividad del virus en cultivos celulares; asimismo, estos anticuerpos protegen pasivamente ratones infectados con rotavirus (40).

Al comparar las secuencias de aminoácidos de las VP4's de distintos orígenes se encontró que existe mayor similitud entre las VP4's de cepas aisladas de una misma especie animal, lo que sugiere que VP4 puede ser responsable de la especificidad de especie que se presenta en los rotavirus (31).

Hasta ahora, no se sabe con exactitud la(s) función(es) específica(s) de cada una de las proteínas de capa externa en las primeras interacciones de rotavirus con su célula huésped. La proteína VP4, al igual que VP7, ha sido sugerida como la proteína responsable de la adsorción (como se discutirá mas adelante). El problema para definir esta(s) función(es) se hace más complicado debido a que la interacción de estas dos proteínas en el virión puede originar cambios en el fenotipo determinado por una de ellas. Así, se ha encontrado que la reactividad a ciertos Mabs contra VP4 se modifica por la presencia de una VP7 en particular (7); del mismo modo, algunas otras propiedades del virus como la formación y tamaño de placas líticas, determinado por VP4, se ven afectadas por la presencia de una VP7 de distinto origen (6).

Por estudios de criomicroscopía electrónica y reconstrucción de imágenes, se determinó que VP4 interacciona con la proteína VP6, que se encuentra formando la capa

intermedia de los rotavirus; los efectos de esta interacción sobre un fenotipo determinado por VP4 se desconocen (44)

ADSORCION DE ROTAVIRUS A SU CELULA HUESPED.

El primer paso durante una infección viral productiva es la adsorción del virus a su célula huésped a través del reconocimiento entre una proteína presente en la partícula viral y una molécula receptora localizada sobre la membrana celular. La naturaleza de la molécula receptora es muy variable (proteínas, lípidos, carbohidratos, etc. Ver Apéndice), y altamente específica para cada tipo de virus (26).

Debido a la especificidad existente durante el proceso de adsorción de un virus a su célula huésped, este paso de la infección se ha considerado como el factor principal por el que se establece la restricción de huésped entre los virus, es decir, la capacidad de un virus de replicarse o no en un tipo celular (26).

Existen datos contradictorios con respecto a las moléculas que intervienen en el proceso de adsorción de los rotavirus a su célula huésped. Por un lado, las dos proteínas de capa externa, VP4 y VP7, han sido sugeridas como las responsables de la adsorción (3, 14, 46, 47). Por otro lado, los residuos de ácidos siálicos sobre la membrana celular son importantes para la infección con rotavirus animales pero no para la infección con rotavirus humanos (13, 60).

Por parte del virus, no es claro cual de las dos proteínas de la capa externa, VP4 ó VP7, funciona como proteína viral de adsorción; sin embargo, existen datos que favorecen a VP4 como responsable de esta función. Se han aislado Mabs neutralizantes dirigidos contra el polipéptido VP8 que inhiben la adsorción del virus a la célula huésped en cultivo (46), lo que sugiere a VP4 como la proteína responsable de la adsorción, específicamente a través de VP8. Cabe mencionar que Mabs neutralizantes que reconocen epítopes en VP5 y VP7 no inhiben la adsorción del virus a células en cultivo pero sí son capaces de neutralizar partículas virales previamente unidas a estas células. Se ha sugerido que estos anticuerpos bloquean algún paso posterior a la adsorción, tal como la penetración y/o el desnudamiento del virus (46).

En lo que se refiere al receptor que utilizan los rotavirus para adsorberse a la célula e infectarla, las cepas animales requieren de la presencia de ácidos siálicos sobre

la membrana celular, ya que células epiteliales en cultivo tratadas con neuraminidasas son resistentes a la infección por estos virus (13, 23, 53, 54, 58, 60). La infectividad de los rotavirus animales también es inhibida tanto *in vitro* como *in vivo* por la presencia de sialoglicoproteínas como mucina y glicoforina A (gphA) (13, 60); el efecto inhibitorio de estas glicoproteínas se debe a los ácidos siálicos que contienen, puesto que cuando se tratan estas glicoproteínas con neuraminidasas, el efecto inhibitorio desaparece. Por otro lado, la presencia de una lectina derivada de *Limulus polyphemus*, que interacciona específicamente con el ácido N-5-acetilneuramínico, también disminuye la infectividad de los rotavirus animales; no ocurre lo mismo con lectinas que reconocen otro tipo de carbohidratos, como Gal y NAcGal, como sitios de unión (60).

Aunque es reconocida la importancia de los residuos de ácido siálico durante la infección con rotavirus animales, no se conoce con exactitud su naturaleza pero se ha sugerido que aquellos ácidos acetilados en las posiciones 7 y 9 podrían ser importantes (58). Los ácidos siálicos podrían formar solamente parte del receptor de rotavirus, ya que la molécula de ácido N-5-acetilneuramínico por sí misma no inhibe la adsorción de rotavirus animales a células en cultivo (23).

Con respecto al receptor que utilizan los rotavirus *in vivo*, existen dos proteínas de alto peso molecular (aproximadamente 300 Kd, obtenidas a partir de un extracto de proteínas de células epiteliales de intestino de ratón), que, por un ensayo *in vitro*, son capaces de unir una cepa de rotavirus animal (RRV). Estas proteínas están presentes en células epiteliales del intestino delgado y no de otros tejidos; asimismo, se encuentran solamente en células epiteliales derivadas de ratones susceptibles a la infección por rotavirus. La unión del virus a las proteínas de 300 Kd es inhibida por el tratamiento con neuraminidasas, lo que sugiere que la presencia de ácidos siálicos es necesaria para la unión del virus. Así, se ha sugerido que estas proteínas pueden constituir el receptor para rotavirus en enterocitos (3). VP4 expresada en baculovirus, se une a las proteínas de 300 Kd y es capaz de competir por la unión con el virus. De estos datos, surgió la hipótesis de que la unión de rotavirus a las proteínas de 300 Kd es a través de VP4; sin embargo, en este sistema, la unión del virus también se inhibe con Mabs neutralizantes que reconocen epítopos en VP5 y VP7, que parecen inhibir pasos posteriores a la adsorción del virus, en células en cultivo (46).

En muchos sistemas virales, las proteínas de adsorción también son responsables de la aglutinación de eritrocitos, por lo que se ha considerado que la unión virus-célula huésped y virus-eritrocito son equivalentes. En los rotavirus animales, VP4 es

responsable de la hemaglutinación y, como se ha mencionado, existen datos que sugieren que podría ser la proteína viral de adsorción a la célula huésped. Esta hipótesis se refuerza por el hecho de que en ambos tipos de interacción (adsorción a la célula huésped y al eritrocito), los residuos de ácido siálico sobre la membrana celular son determinantes. Existen, sin embargo, otros virus en los que las proteínas responsables de la adsorción y de la hemaglutinación son diferentes, como en los Coronavirus, por lo que es necesario explorar este aspecto en los rotavirus. (18).

A pesar de la importancia que tienen los residuos de ácido siálico en la infección por rotavirus animales *in vivo*, se ha encontrado que, cuando la adsorción viral se ensaya con extractos lipídicos de intestino de ratón o de cerebro bovino separados en placas cromatográficas (50), el virus se une solamente a compuestos carentes de ácidos siálicos (incluyendo la forma asializada de GM1, que parece mediar la adsorción de rotavirus animales a células LLCMK2 (53)). En este sistema, otros carbohidratos, como GalNAc y Gal, parecen ser importantes para la unión del virus. Debido a que el virus es capaz de adsorberse a compuestos de diferente naturaleza (con o sin ácidos siálicos), se sugirió que los rotavirus pueden reconocer más de un receptor en la célula huésped para iniciar la infección (50). De ser así, sería necesario determinar si la unión es a través de la misma proteína viral. Es necesario considerar que la unión de rotavirus a compuestos carentes de ácidos siálicos en un sistema *in vitro* puede no representar la unión natural del virus a su célula huésped.

Los rotavirus humanos, por su parte, no requieren de ácidos siálicos en la superficie de la célula huésped para infectarla, ya que el tratamiento de estas células con neuraminidasas no tiene efecto sobre la adsorción ni sobre la infectividad de estos virus (13). De acuerdo con estas observaciones, y, a diferencia de los rotavirus de origen animal, los rotavirus de origen humano no aglutinan eritrocitos. Los requerimientos de los rotavirus humanos para la adsorción e infección a la célula huésped no se conocen, a pesar de que en cultivo infectan las mismas células que los rotavirus animales.

Es importante mencionar que en variantes antigénicas de rotavirus, seleccionadas en presencia de Mabs neutralizantes contra VP4, los cambios en cepas animales se localizan principalmente en VP8 (aminoácidos 88, 100, 114, 150 y 188) (33, 35); existe un solo Mab que selecciona variantes antigénicas con cambios en VP5 (aminoácido 393) (33). En contraste, entre cepas de rotavirus humanos, los cambios en variantes antigénicas seleccionadas con Mabs que reconocen VP4, han sido localizados en VP5 de

manera preferencial (aminoácidos 305, 392, 433 y 439) (35, 55). Estas observaciones pueden ser indicio de un arreglo diferente entre las VP4 de ambos grupos de rotavirus, y podrían traducirse en un efecto funcional determinado.

PENETRACION DE ROTAVIRUS.

El paso siguiente a la adsorción viral es la penetración y desnudamiento del virus para iniciar la replicación del genoma viral. Este proceso parece ser particular para cada sistema virus-célula y, en la mayoría de los casos, los mecanismos moleculares son poco conocidos. De manera general, existen evidencias de que hay, al menos, tres formas diferentes por las que los virus penetran a la célula: fusión de membranas, endocitosis y "penetración directa" (25, 57). No es claro cual de estas tres formas conducen a una infección productiva en la mayoría de los sistemas virales.

En los sistemas virales más estudiados, los viriones sufren cambios estructurales después de un paso de "activación" (exposición a pH ácido, interacción con su receptor, etc.), que resultan en un incremento de su hidrofobicidad facilitando así su interacción con la membrana celular y, consecuentemente, su penetración a la célula (5, 25, 45).

Se han propuesto dos rutas de entrada de los rotavirus a la célula huésped, solamente una de las cuales conduce a una infección productiva. La ruta de entrada depende del tratamiento del virus con tripsina. Los viriones intactos, entran a la célula lentamente por endocitosis y no producen progenie viral; mientras que la entrada del virus tratado con tripsina es más rápida y conduce a una infección productiva; en este caso, se ha propuesto un mecanismo de "penetración directa", en la que el virus interactúa con la membrana celular formando poros (20). El mecanismo molecular de este proceso no se conoce.

Existe una región de carácter hidrofóbico en VP4, entre los aminoácidos 385 y 401, que presenta cierta homología (45% de identidad), con una región localizada en la proteína de fusión de los alfavirus (ej. virus Sindbis y Semliki Forest) (24, 33); esta región parece ser muy importante durante el proceso de fusión del virus Semliki Forest, que da como resultado la penetración de éste a su célula huésped (24, 27). En los rotavirus, se desconoce si esta región de carácter hidrofóbico posee una función específica durante la penetración del virus, sin embargo, se ha observado que existen

Mabs contra esta región que neutralizan la infectividad del virus en algún paso posterior a la adsorción, lo que sugiere su importancia (34).

La adsorción de rotavirus a la célula huésped no depende del corte de VP4 con tripsina, ya que el virus se adsorbe de igual forma si está o no cortado (20); sin embargo, la penetración viral que conduce a una infección productiva sí requiere que el virus se corte con tripsina. Asimismo, el corte con tripsina cambia las propiedades del virión volviéndolo más hidrofóbico y capaz de interactuar con liposomas con diferente contenido de lípidos, aunque carentes de ácidos siálicos (38). No se sabe cuales son los cambios que permiten la interacción con liposomas, pero algunas regiones hidrofóbicas muy conservadas en VP4 podrían ser las directamente responsables, tales como las regiones alrededor de los sitios de corte con tripsina y la "región hidrofóbica" localizada entre los aminoácidos 385 y 401.

La restricción de huésped que se presenta entre los rotavirus parece no ser a nivel de adsorción viral, como en muchos sistemas virales, sino a nivel de penetración. Los rotavirus se adsorben a una gran variedad de líneas celulares pero solamente infectan algunas de ellas. Esta restricción no es a nivel de replicación o ensamblaje, ya que las células no permisibles producen progenie viral cuando las partículas virales se les introducen utilizando liposomas (2). Estas observaciones involucran a VP4 en el proceso de penetración del virus y sugieren la existencia de dos entidades (moléculas diferentes o dominios diferentes de una sola molécula), que están involucradas en la adsorción y penetración del virus, de manera independiente.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La infectividad de los rotavirus animales, como se mencionó anteriormente, depende de residuos de ácido siálico sobre la membrana celular por lo que el tratamiento de las células con neuraminidasas y la preincubación del virus con ciertas glicoproteínas con alto contenido de ácidos siálicos inhiben la infección. Aparentemente, esta inhibición se debe a que el virus no puede adsorberse a la célula huésped de una manera eficiente. La hemaglutinación provocada por estos virus es igualmente inhibida por los mismos factores. Por otro lado, los rotavirus de origen humano no requieren de ácidos siálicos para infectar a su célula huésped y no aglutinan eritrocitos.

Se presume que los fenómenos de adsorción de los rotavirus animales al eritrocito y a la célula huésped son equivalentes y mediados por las mismas moléculas del virus y de la célula. Debido a que VP4 es la hemaglutinina viral, esta proteína debería actuar como la proteína viral de adsorción.

La mayoría de los avances en el campo de los rotavirus se ha realizado por estudios con rotavirus animales infectando células en cultivo. En este sistema, se han realizado pocos estudios relacionados con la adsorción y penetración de cepas de rotavirus humanos. Algunos de estos trabajos han permitido observar que los rotavirus humanos tienen distintos requerimientos que los rotavirus animales durante la adsorción a la célula, y por lo tanto las moléculas que intervienen en este proceso podrían ser diferentes.

Este trabajo se llevó a cabo con el objeto de conocer un poco más acerca de las moléculas que intervienen en los primeros estadios de la infección por rotavirus a su célula huésped en cultivo, específicamente aquella infección en la que los residuos de ácidos siálicos resultan determinantes.

La estrategia utilizada consistió en seleccionar y caracterizar variantes de rotavirus de origen animal cuya infectividad, a diferencia del virus silvestre, fuera resistente al tratamiento de las células con neuraminidasas ó a la presencia de una proteína con alto contenido de ácidos siálicos, como la glicoforina A, que ha sido identificada como el receptor de rotavirus en el eritrocito. El estudio de estas variantes sería de utilidad para conocer algunos aspectos involucrados en la adsorción y penetración de los rotavirus.

R E S U L T A D O S .

JOURNAL OF VIROLOGY

A publication of the American Society for Microbiology

May 13, 1993

Dr. Susana Lopez
Department de Biologia Molecular
Instituto de Biotecnologia
University Nacional Autonoma de Mexico
Apartado Postal 510-3
Colonia Miraval
Cuernavaca, Morelos 62271
Mexico

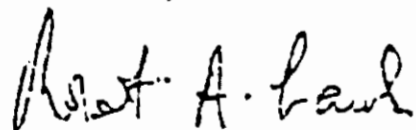
RE: JVI 361-93

Dear Dr. Lopez:

Your paper has been reviewed by experts within your field and I enclose their comments. The reviewers found the work to be interesting and have made some constructive comments that you will want to address.

Please return two revised copies of your paper to me (including Tables and Figures) as soon as possible with a letter describing your response to each of the reviewer's comments, and let me know how the paper has been altered.

Sincerely yours,



Robert A. Lamb, Ph.D., Sc.D.

RAL/fls
enclosure

xc: ASM Publications Office

Editor

ROBERT A. LAMB
Department of Biochemistry,
Molecular Biology and Cell Biology
Northwestern University
2153 Sheridan Road
Evanston, IL 60208-3500
Phone: (708) 491-5433
Fax: (708) 491-2467

Journals Division

American Society for Microbiology
Journals Division
1325 Massachusetts Avenue, N.W.
Washington, DC 20005-4171
Phone: (202) 737-3600

Revised version, ms# JVI 361-93

**Binding to Sialic Acids Is Not an Essential Step for the Entry of
Animal Rotaviruses to Epithelial Cells in Culture**

Ernesto Méndez, Carlos F. Arias, and Susana López*

Departamento de Biología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional
Autónoma de México, Apartado Postal 510-3, Colonia Miraval, Cuernavaca, Morelos
62271, México. Tel (5273) 11-4900. Fax (5273) 17-2388

Running title: Rotavirus cell entry

*Corresponding author

Key words: rotavirus, viral receptor, sialic acids, cell entry

ABSTRACT

The infection of target cells by animal rotaviruses requires the presence of sialic acids on the cell surface. Treatment of the cells with neuraminidases (NA) or incubation of the viruses with some sialoglycoproteins, like glycophorin A (gphA), greatly reduces virus binding, with the consequent reduction of virus infectivity. In this work we report the isolation of animal rotavirus variants whose infectivity is no longer dependent on the presence of sialic acids on the cell surface. In addition, although these variants still bind to gphA as efficiently as the wild type virus, this interaction no longer inhibits the virus infection. These observations indicate that the initial interaction of the mutants with the cell is through a site different from the sialic acid-binding site located on VP8, the smaller trypsin cleavage product of VP4. Reassortant analysis showed that the mutant phenotype segregates with the VP4 gene. Neutralizing monoclonal antibodies (mAbs) directed to VP4 and VP7 were tested for their ability to neutralize the variants; antibodies to VP7 and VP5, the larger trypsin cleavage product of VP4, neutralized the mutants as efficiently as the wild type viruses. In contrast, although the mAbs directed to VP8 were able to bind to the mutants, they showed little or no neutralizing activity. The implications of these findings in the attachment and penetration of rotaviruses to epithelial cells in culture are discussed.

INTRODUCTION

Rotaviruses are the single most important etiologic agents of severe dehydrating infantile gastroenteritis in developed and developing countries (5). These viruses are composed of a segmented double-stranded RNA genome surrounded by three concentric layers of proteins (32). The outermost layer is formed by two proteins, VP4, coded by RNA segment 4, and VP7, coded by RNA segment 7, 8 or 9, depending on the rotavirus strain (8).

VP4 forms spikes that extend from the surface of the virus particle (1, 31), and is involved in a variety of viral functions, including virulence (14, 30), agglutination of red blood cells (hemagglutination) (17, 24), and trypsin-enhanced plaque formation (9). *In vitro* treatment of virions with trypsin results in the specific cleavage of VP4 to polypeptides VP5 and VP8, of approximately 60 and 26.5 kDa, respectively, with a concomitant enhancement of viral infectivity (7, 9, 22). The activation of the virus by trypsin has been associated with the entry of the virus by direct cell membrane penetration (18, 29). Both, VP4 and VP7 proteins have been proposed to be responsible for the initial attachment of rotavirus to the target cell (13, 34), however, recent evidence points to VP4 as the viral attachment protein (4, 12).

Hemagglutination (HA) and the attachment of animal rotaviruses to target epithelial cells is mediated by sialic acid-containing compounds, since treatment of cells with neuraminidases (NA) abolishes HA and greatly reduces the binding of the virus to the surface of the target cell (12, 19, 39, 41). In addition, HA can be inhibited by incubation of the virus with the sialoglycoprotein glycoporphin A (gphA) (12, 24), which has been shown to be the protein in the red blood cell membrane that mediates the virus attachment (12, 24). The binding of the virus to epithelial cells is also

inhibited by gphA (12), and several sialoglycoproteins have been shown to inhibit the replication of the virus both *in vivo* and *in vitro* (41). Recently, several different sialic acid-containing membrane components have been proposed to serve as binding sites for animal rotaviruses in epithelial cells (4, 36). In contrast to the requirements of animal rotaviruses, the infection of cells by human rotaviruses is not dependent on the presence of sialic acids on the cell surface and is not inhibited by gphA (12).

In this work we report the isolation and characterization of animal rotavirus variants whose infectivity is no longer inhibited by treatment of cells with neuraminidases or incubation with glycophorin A.

MATERIALS AND METHODS.

Viruses and Cells. Rotavirus SA114S (clone 3) was obtained from M.K. Estes, Baylor College of Medicine, Houston, TX; RRV and DS1XRRV rotaviruses were obtained from H. B. Greenberg, Stanford University, Stanford, CA. DS1XRRV is a reassortant between human DS1 and simian RRV rotavirus strains. This reassortant was reported to have the VP7 gene from DS1 (gene 8) and all other genes from the RRV parent (27). RNA-RNA hybridization (11) experiments with the parental strains DS1 and RRV showed that the DS1XRRV reassortant available in our laboratory has gene 5, in addition to gene 8, derived from the DS1 parent, and all other genes from RRV. All rotavirus strains were propagated in MA104 cells as described (6). MA104 cells were used for all experiments carried out in this work, including the isolation and subsequent characterization of the variants.

Isolation of the nar and gpr variants. To select for nar (neuraminidase-resistant) variants, RRV and DS1XRRV viruses were activated with trypsin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 30 min at 37°C) and used to infect cells that had been previously treated for 1 h at 37°C with 20 mU/ml of NA from *Arthrobacter ureafaciens* (Sigma Chemical Co.). After 1 h adsorption, the inoculum was removed, the cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS), and Eagle's minimal essential medium (MEM) was added. The cells were incubated at 37°C until cytopathic effect was observed. To select for the gpr (glycophorin A-resistant) variants, trypsin-activated RRV and DS1XRRV virus stocks were preincubated with 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of gphA (Sigma Chemical Co.) for 1 h at 4°C, and subsequently adsorbed for 1 h at 4°C on untreated cells. After this time, the inoculum was removed, and the cells were washed and incubated as described for the nar mutants. After three passages under selective pressure of a single pool of virus for each treatment, the viruses were plaqued in the corresponding selective conditions

and about 50 clones were selected from each condition to characterize their phenotype. The viruses that were confirmed to be resistant to the corresponding inhibitory treatment were then three times plaque-purified.

Virus infectivity assay. Monolayers of MA104 cells grown in 96-well tissue culture plates were treated with two-fold dilutions of NA from *Arthrobacter ureafaciens* (starting from 40 mU/ml) as described above. After two washes with PBS, the cells were infected with approximately 500 focus forming units (ffu) per well; the virus was adsorbed for 1h at 37°C, and the inoculum removed. The cells were then incubated for 14-16 h at 37°C. After this time, the cells were fixed and stained by an immunoperoxidase assay as previously described (21). When gphA was used, viruses were incubated with two-fold dilutions of this sialoglycoprotein (starting from 200 µg/ml) for 1h at 4°C before infecting untreated cells. The adsorption and all subsequent steps were as described above. Virus infectivity in the different conditions is reported as the percentage of the ffu present in untreated cells infected with the corresponding virus strain.

HA and HA inhibition assays. The HA assay was carried out with type O human red blood cells, essentially as described by Lizano et al.(21). The HA activity of each virus was standardized to ffu/ml. To test the effect of NA on HA, erythrocytes were treated with different concentrations (1, 10 and 20 mU/ml in PBS) of NA from *A. ureafaciens* or *V. cholerae* (Sigma, Chemical Co.) for 1 h at 37°C, washed twice with PBS, and then mixed with two-fold dilutions of the virus stocks. To test for the inhibition of HA by gphA or mAbs, serial two-fold dilutions in PBS of gphA (starting from 100 µg/ml) or mAbs, were incubated with 4 hemagglutinating units of the virus; after 1 h at 4°C (gphA) or at room temperature (mAbs), a suspension of erythrocytes

(0.4% v/v) was added to the VP4 mAb- or gphA-virus mixture. The HA and inhibition of HA were scored after a 60 min incubation at room temperature.

Generation of reassortant viruses. Reassortants were obtained by co-infection of MA104 cells with either of the mutant viruses gpr8 or gpr34 and SA114S, each at a m.o.i. of 10. The virus progeny resulting from these co-infections was plaque-assayed on NA (*A. ureafaciens*)-treated cells (20 mU/ml, 1 h at 37°C). The genome of the resulting plaques was analyzed by RNA electrophoresis and RNA-RNA hybridization (11), and selected reassortant viruses were plaque-purified three times in NA-treated cells and then assayed for NA resistance.

Virus neutralization assay. Neutralizing mAbs M11, 1A9, M14, 7A12, 2G4, 2F1, 4F8, and 159 (25) were provided by H. B. Greenberg, Stanford University, Stanford, CA. Neutralizing mAb S2-2G10 (15) was obtained from K. Taniguchi, Sapporo Medical College, Sapporo, Japan. The neutralization assay was carried out as previously described by Lizano et al (21).

RESULTS

Isolation of sialic acid-independent mutants. To study the events involved in the early interaction of rotaviruses with cultured epithelial cells, we isolated animal rotavirus mutants whose infectivity is no longer dependent on the presence of sialic acids on the cell surface, and is not inhibited by incubation with gphA. To isolate these mutants, RRV and DS1XRRV rotaviruses were grown either on NA-treated cells, or in untreated cells but in the presence of gphA. After three passages under selective pressure, the viruses were plaqued and about 50 clones from each condition were selected for characterization. The infectivity of two clones of the virus grown in NA-treated cells was confirmed to be resistant to this treatment (nar mutants), while nine clones of the virus grown in the presence of gphA were not neutralized by incubation with gphA (gpr mutants). The rest of the clones tested for each condition were still sensitive to the corresponding inhibitory treatment. The phenotype of both types of mutants was stable after six passages under non-selective conditions. All nar and gpr mutants isolated were derived from the DS1XRRV parent; no variants were isolated from the RRV virus.

The infectivity of RRV or DS1XRRV was reduced to about 20% when the cells were treated with concentrations of NA from *Arthrobacter ureafaciens* as low as 2.5 mU/ml; in contrast, the infectivity of the nar mutants remained unaffected even at NA concentrations 15 times higher (Fig. 1). Similar results were obtained when NA from *Vibrio cholerae* was used (not shown). When the inhibitory effect of gphA on the infectivity of the gpr mutants and wild type viruses was compared, a marked difference was again observed (Fig. 2). The infectivity of RRV and DS1XRRV was reduced to less than 20% in the presence of 50 μ g/ml of gphA, while up to 200 μ g/ml of gphA did not affect the infectivity of the gpr mutants:

When we analyzed the gpr mutants for their ability to infect NA-treated cells we found that, like the nar mutants, their infectivity was not affected by the NA-treatment (Fig. 3). Similarly, the infectivity of the nar mutants was resistant to the presence of gphA (data not shown). These results suggest that the mutations in the nar and gpr variants are closely related. The phenotype of these mutants is not restricted to MA104 cells since they are able to infect several different NA-treated epithelial cell lines in culture(26).

The gpr and nar mutants were selected from a stock of DS1XRRV which by RNA electrophoresis and hybridization analysis was shown to have genes 5 and 8 (encoding NS53 and VP7, respectively) from DS1, and all other genes from RRV (see materials and methods). By a HA inhibition assay, using VP7 serotype-specific mAbs, the DS1XRRV virus was confirmed to have the G2 specificity. However, analysis of the mutant viruses with the same mAbs showed that they all had a serotype G3 specificity (Table 2), that is, their VP7 seemed to be derived from RRV and not from DS1. Analysis of the parental origin of the RNA segments of the mutants by RNA-RNA hybridization showed that all mutants had only gene 5 from DS1 and all other genes, including the VP7 gene, from RRV, confirming the HA inhibition results. This finding was unexpected, since as mentioned before, the stock of DS1XRRV used in these experiments had the DS1 VP7 gene. We also compared the structural protein patterns of RRV, DS1XRRV, and some selected mutants, and we found that the VP6 of RRV migrated by PAGE evidently faster than the VP6 from all other strains, including the DS1XRRV virus (data not shown). The difference in migration between the VP6 proteins of RRV and the DS1XRRV reassortant probably represents amino acid changes acquired by either virus during passage in MA104 cells, since as mentioned in Material and Methods, the DS1XRRV VP6 gene was shown to be derived from the

RRV parent by hybridization analysis. The reassortant virus containing only gene 5 of DS1 could not be detected, by genomic RNA electrophoresis analysis, in more than one hundred plaques analyzed from the original DS1XRRV virus stock passaged in the absence of NA or gphA pressure.

The nar and gpr mutants bind to sialic acids. Eventhough the mutants were able to infect cells in the presence of gphA or cells with low-content or no sialic acids on their surface, it was not clear if this phenotype was due to the lack of interaction between the viruses and sialic acids. In order to investigate this, we tested the ability of the mutants to agglutinate red blood cells. We found that all mutants were able to hemagglutinate to titers similar to those of wild type (wt) RRV and DS1XRRV viruses; furthermore, this HA was abolished by preincubation of the mutants with the same concentration (200 to 750 ng/ml) of gphA needed to inhibit the HA of RRV or DS1XRRV. The HA caused by the mutants was also inhibited by treatment of the red blood cells with NA at concentrations as low as 1 mU/ml. These results indicate that the sialic acid-binding site on the VP4 protein of the variants is functional, but it is no longer needed for the infection of MA104 cells. The fact that the infectivity of the mutants is not blocked by the interaction with gphA, and is not sensitive to NA, indicates that there must be another site on either VP4 or VP7 which is primarily responsible for the interaction of the mutants with the host cell.

The mutant phenotype segregates with gene 4. In order to identify the gene responsible for the mutant phenotype, we isolated viruses resulting from the co-infection with either mutant gpr8 or gpr34, and the simian rotavirus SA114S, whose infectivity is sensitive to NA-treatment of the cells (Fig. 1). The infectivity of selected clones from the progeny viruses was assayed for their NA resistance. Two groups of reassortants with clearly different phenotypes were observed (Fig. 4), those which

were resistant to NA-treatment and those whose infectivity on NA-treated cells was similar to that of SA114S. The viral genome of more than 200 clones was analyzed by RNA electrophoresis; although a single gene 4 reassortant was not obtained, this analysis, confirmed by RNA-RNA hybridization of selected clones, showed that the mutant phenotype segregates with gene 4, which codes for VP4 (Table 1).

Reactivity of the mutant viruses with neutralizing mAbs. In order to study possible conformational changes in the surface proteins of the mutant viruses, we analyzed their reactivity with a panel of neutralizing mAbs directed at the VP4 and VP7 proteins of RRV. All the RRV antibodies tested reacted to a similar degree with RRV and the variants by a HA inhibition assay (Table 2), suggesting that there was not a gross change in the conformation of the mutant VP4. The mAbs were also tested for their ability to neutralize the infectivity of the viruses when assayed both in NA-treated and untreated cells (Table 3). In NA-treated cells, all mAbs directed at VP8 (M11, M14, 1A9, 7A12) failed to neutralize or neutralized very poorly the nar and gpr mutants, while these viruses were readily neutralized by mAbs directed at VP5 (2G4) and VP7 (4F8). In untreated cells the mutants were still somewhat refractory to neutralization by mAbs to VP8, while these mAbs efficiently neutralized the RRV and DS1XRRV strains; in contrast, mAbs directed at VP5 (2G4) and VP7 (4F8) neutralized the mutant and wild type viruses to a similar extent. Interestingly, all mAbs tested (both to VP4 and VP7) neutralized the variants more efficiently in untreated than in NA-treated cells; this was especially evident with the VP8 mAbs M14 and 7A12, which neutralized the variants 8 to 32-fold more efficiently in untreated as compared to NA-treated cells. This observation suggests that the presence of sialic acids in the cell surface facilitates the neutralization process; however, the mechanism through which this might occur is not clear. It is also interesting to note that in untreated

cells, the VP8 mAbs neutralized the different mutants to titers that can differ up to 16-fold , suggesting that the changes in the various mutants are not identical.

DISCUSSION

In this work we report the isolation of rotavirus mutants whose infectivity of epithelial cells in culture is no longer inhibited by treatment of the cells with NA or incubation with gphA. The mutants were isolated from a stock of the reassortant virus DS1XRRV, which contains gene 5 and gene 8 (VP7 gene) from DS1 and all other genes from RRV. Analysis by hybridization of the parental origin of the RNA segments of the mutant viruses showed that all of them had only gene 5 from DS1 and all other genes, including the VP7 gene, from RRV. The most likely explanation for this is that the DS1XRRV virus stock used was slightly contaminated with the RRV parent.

Whatever the origin of the RRV VP7 gene in the DS1XRRV virus stock, it was present in very low proportion compared to the DS1 corresponding gene, since it was not detected neither by RNA electrophoresis nor by hybridization. Despite of this, the RRV VP7 gene was positively selected in the mutants, suggesting that the RRV VP7 protein was determinant for the expression of the VP4 mutant phenotype. However, the presence of the RRV VP7 protein does not seem to be sufficient for the expression of this phenotype since neither nar nor gpr variants were isolated from the RRV virus stock. There are two differences between the mutant viruses and RRV that could be involved in favoring the selection of the variants. The first is their VP6 proteins, which have a different electrophoretic migration rate that most likely reflects amino acid variations, and the second is the origin of gene 5, which in the mutants is derived from DS1. However, it is difficult to see how a non-structural protein (coded by gene 5) could influence the selection of a specific VP4. Further studies are needed to clarify this issue.

The HA domain of animal rotaviruses has been mapped to amino acids 42 to 247 of VP8 (10, 21), the smaller trypsin cleavage product of VP4. This domain seems to be

unaffected in the mutants since, as the wt viruses, the variants are able to hemagglutinate and this HA is inhibited by treatment of the red blood cells with NA and by the presence of gphA. In addition, the mutant viruses are still able to bind to neutralizing mAbs that interact with VP8 at amino acid positions 87 (M11), 100 (1A9), 148 (M14), and 188 (7A12) (25), indicating that these sites are also conserved in the mutants.

It has been reported that gphA as well as the mAbs directed to VP8 neutralize virus infectivity through inhibiting the binding of the virus to the cell (12, 33). The fact that the infectivity of the nar and gpr mutants was poorly or not neutralized by incubation with either gphA or mAbs to VP8, despite of being able to interact with them, suggests that the binding of the virus to the cell is through a site in VP4 different from the sialic acid-binding domain on VP8. This site could be located either in a different region of VP8, or most likely in VP5. The existence of this site has been unmasked by the mutant phenotype but we presume that it mediates an interaction of the virus with the cell that probably occurs during the entry of wt animal rotaviruses as well.

Previous reports have indicated that rotaviruses bind to a wide variety of cell types, however, productive infection has only been observed to occur in a subset of the tested cells (3). In L cells for example, rotaviruses are able to bind but not to infect the cells, and the host restriction seems to be at the penetration level, since the cells became permissive for rotavirus replication when the virus was transfected into them (2, 3).

Based on these observations, we suggest that there are at least two sites on the VP4 protein of animal rotaviruses that interact with the cell surface during virus entry.

In this model, the sialic acid-binding site on VP8 mediates the initial interaction of the virus with the cell, through a sialic acid-containing structure in the cell membrane. We believe this interaction is of a promiscuous nature and does not lead to virus penetration by itself; however, it facilitates a second VP4-cell interaction, mediated by a sialic acid-independent site on VP4. We propose that this second interaction is more specific and probably determines, at least in some cases, whether the cell is susceptible to infection. The cellular compound involved in the second interaction could be the same or different from the sialic acid-containing structure responsible for the initial binding of the virus. The interaction with the cell surface of the two sites on VP4 could be sequential in time or they could occur simultaneously; however, the sialic acid-dependent interaction would be a requisite for the second interaction to occur efficiently, probably by inducing a conformational fit on VP4. An analogous observation has been reported for the interaction of the human immunodeficiency virus gp120 protein with the D1 domain of CD4, the virus receptor protein. Two regions of the CD1 domain, CDR2 and CDR3, have been involved. After gp120 binding via CDR2, the CDR3 region engages in a subsequent CD4-gp120 interaction that may be involved in the fusion event subsequent to the initial binding (28, 38).

The ability of the nar and gpr mutant viruses to infect in the presence of gphA, or NA-treated cells, could be explained if the mutation(s) had increased the affinity of the sialic acid-independent interaction, such that the mutant VP4 were able to interact effectively with the cell surface even in the absence of the first interaction. In view of what it is known of the functional domains of VP4 (23), two attractive candidate regions for the location of the sialic-independent site are the trypsin cleavage region associated with the enhancement of the viral infectivity (22), and the region around amino acid 393, which has been suggested is a fusion peptide (25).

The nucleotide sequence of the mutant genes should give us information at this respect.

The nature of the cellular rotavirus receptor remains controversial. Several reports have shown that sialic acid residues are important for virus binding (12, 19, 36) and replication of the virus both *in vitro* and *in vivo* (12, 36, 39, 41); other studies, using a thin layer chromatography overlay assay, have shown that rotaviruses bind only to asialo-compounds from a mixture of glycolipids extracted from either bovine brain or mouse small intestine (35, 40). Based on these findings it has been suggested that rotaviruses could interact with more than one cellular molecule during virus entry (35). These observations are in line with our proposed model.

It is interesting that neither the NA-treatment of the cells nor the incubation with gphA completely abolished the infectivity of the wt viruses. This could be explained if these viruses were able to interact directly with the cell through both, the sialic acid-dependent and -independent sites on VP4, although less efficiently through the second site. This weaker second interaction would only be evident when the first interaction does not take place. It can not be discarded however, that the residual infectivity observed with the wt viruses in NA-treated cells could be mediated by a small amount of sialic acids left in the cell surface after the treatment.

The distribution of the mutations that allow viruses to escape neutralization by mAbs directed at VP5 and VP8 is markedly different in animal and human rotavirus strains. For animal strains, the escape mutations for 16 of 19 neutralizing VP4 mAbs map in VP8 (in five different epitopes) and the other 3 in VP5 (in one epitope) (16, 25). This is in contrast with the situation for human rotaviruses, where only 4 of 26

neutralizing mAbs directed at VP4 interact with VP8, while the rest of them interact with 3 different epitopes on VP5 (16, 20, 31, 37). In addition, as mentioned before, the infection of human rotaviruses is not dependent on sialic acids and is not inhibited by gphA. Altogether, these data suggest that the VP8 region, as seems to be the case for the gpr and nar mutants, is not essential for the binding and penetration of human viruses to epithelial cells. It is tempting to suggest that human rotaviruses interact with the cell surface directly through a site similar to the sialic acid-independent site identified in animal rotaviruses. If this hypothesis holds true it will explain many of the discrepancies observed when the requirements for infectivity of human and animal rotaviruses have been compared. Studies to support this hypothesis and to further characterize the nar and gpr mutants as well as the proposed asialo cellular receptor for rotaviruses are in progress

ACKNOWLEDGMENTS

This work was partially supported by grants 75191-527101 from the Howard Hughes Medical Institute and RF89088#66 from the Rockefeller Foundation. We are thankful to H. B. Greenberg and K. Taniguchi for kindly providing the monoclonal antibodies used in this work. We also thank Rubén Blancas for his help in the characterization of the reassortant viruses.

REFERENCES.

1. Anthony, I. D., S. Bullivant, S. Dayal, A. R. Bellamy and J. A. Berriman. 1991. Rotavirus spike structure and polypeptide composition. *J. Virol.* 65:4334-4340.
2. Bass, D. M., M. R. Baylor, C. Chen, L. Meng and H. B. Greenberg. 1992. Liposome mediated transfection of intact viral particles reveals that plasma membrane determines permissivity of tissue culture cells to rotavirus. *J. Clin. Invest.* 90:2313-2320.
3. Bass, D. M., M. R. Baylor and H. B. Greenberg. 1992. Cellular tropism of rotavirus in tissue culture is determined by viral penetration of the cell plasma membrane, abstr. N 102, p. 114. Keystone Symposium on Cell Biology of Virus Entry, Replication and Pathogenesis. 1992.
4. Bass, D. M., E. R. Mackow and H. B. Greenberg. 1991. Identification and partial characterization of a rhesus rotavirus binding glycoprotein on murine enterocytes. *Virology* 183:602-610.
5. de Zoysa, I. and R. G. Feachem. 1985. Interventions for the control of diarrhoeal diseases among young children: rotavirus and cholera immunization. *Bull. World Health Organ.* 63:569-583.
6. Espejo, R., E. Martinez, S. López and O. Muñoz. 1980. Different polypeptide composition of two human rotavirus types. *Infect. Immun.* 28:230-237.

7. Espejo, R. T., S. López and C. F. Arias. 1981. Structural polypeptides of simian rotavirus SA11 and the effect of trypsin. *J. Virol.* 37:156-160.
8. Estes, M. K. and J. Cohen. 1989. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol. Rev.* 53:410-449.
9. Estes, M. K., D. Y. Graham and B. B. Mason. 1981. Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: molecular mechanisms. *J. Virol.* 39:879-888.
10. Fiore, L., H. B. Greenberg and E. R. Mackow. 1991. The VP8 fragment of VP4 is the rhesus rotavirus hemagglutinin. *Virology* 181:553-563.
11. Flores, J., I. Perez, L. White, M. Perez, A. R. Kalica, R. Marquina, R. G. Wyatt, A. Z. Kapikian and R. M. Chanock. 1982. Genetic relatedness among human rotaviruses as determined by RNA hybridization. *Infect. Immun.* 37:648-655.
12. Fukudome, K., O. Yoshie and T. Konno. 1989. Comparison of human, simian, and bovine rotaviruses for requirement of sialic acid in hemagglutination and cell absorption. *Virology* 172:196-205.
13. Fukuhara, N., O. Yoshie, S. Kitaoka and T. Konno. 1988. Role of VP3 in human rotavirus internalization after target cell attachment via VP7. *J. Virol.* 62:2209-2218.

14. Gorziglia, M., K. Green, K. Nishikawa, K. Taniguchi, R. Jones, A. Z. Kapikian and R. M. Chanock. 1988. Sequence of the fourth gene of human rotaviruses recovered from asymptomatic or symptomatic infections. *J. Virol.* 62:2978-2984.
15. Green, K. Y., K. Taniguchi, E. R. Mackow and A. Z. Kapikian. 1990. Homotypic and heterotypic epitope-specific antibody responses in adult and infant rotavirus vaccinees: implications for vaccine development. *J. Infect. Dis.* 161:667-679.
16. Greenberg, H. B. 1992. Rotavirus immunity: More questions than answers, abstr. S6-1, p. 31. Abstr. Fourth International Symposium on Double-Stranded RNA Viruses. 1992.
17. Kalica, A. R., J. Flores and H. B. Greenberg. 1983. Identification of the rotaviral gene that codes for hemagglutination and protease-enhanced plaque formation. *Virology* 125:194-205.
18. Kaljot, K. T., R. D. Shaw, D. H. Rubin and H. B. Greenberg. 1988. Infectious rotavirus enters cells by direct cell membrane penetration, not by endocytosis. *J. Virol.* 62:1136-1144.
19. Keljo, D. J. and A. K. Smith. 1988. Characterization of binding of simian rotavirus SA-11 to cultured epithelial cells. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 7:249-256.
20. Kitaoka, S., N. Fukuhara, F. Tazawa, H. Suzuki, T. Sato, T. Konno, T. Ebina and N. Ishida. 1986. Characterization of monoclonal antibodies against human rotavirus hemagglutinin. *J. Med. Virol.* 19:313-323.

21. Lizano, M., S. López and C. F. Arias. 1991. The amino-terminal half of rotavirus SA114/M VP4 protein contains a hemagglutination domain and primes for neutralizing antibodies to the virus. *J. Virol.* 65:1383-1391.
22. López, S., C. F. Arias, J. R. Bell, J. H. Strauss and R. T. Espejo. 1985. Primary structure of the cleavage site associated with trypsin enhancement of rotavirus SA11 infectivity. *Virology* 144:11-19.
23. López, S., I. López, P. Romero, E. Méndez, X. Soberón and C. F. Arias. 1991. Rotavirus YM gene 4: analysis of its deduced amino acid sequence and prediction of the secondary structure of the VP4 protein. *J. Virol.* 65:3738-3745.
24. Mackow, E. R., J. W. Barnett, H. Chan and H. B. Greenberg. 1989. The rhesus rotavirus outer capsid protein VP4 functions as a hemagglutinin and is antigenically conserved when expressed by a baculovirus recombinant. *J. Virol.* 63:1661-1668.
25. Mackow, E. R., R. D. Shaw, S. M. Matsui, P. T. Vo, M. N. Dang and H. B. Greenberg. 1988. The rhesus rotavirus gene encoding protein VP3: location of amino acids involved in homologous and heterologous rotavirus neutralization and identification of a putative fusion region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 85:645-649.
26. Méndez, E., C. F. Arias and S. López. Unpublished data.
27. Midthun, K., H. B. Greenberg, Y. Hoshino, A. Z. Kapikian, R. G. Wyatt and R. M. Chanock. 1985. Reassortant rotaviruses as potential live rotavirus vaccine candidates. *J. Virol.* 53:949-954.

28. Moore, J. P., B.A. Jameson, R.A. Weiss, and Q.J. Sattentau. 1992. The HIV-cell fusion reaction. In J. Bentz (ed.), *Viral Fusion Mechanisms*. CRC Press, Boca Raton, FL
29. Nandi, P., A. Charpilienne and J. Cohen. 1992. Interaction of rotavirus particles with liposomes. *J. Virol.* 66:3363-3367.
30. Offit, P. A., G. Blavat, H. B. Greenberg and H. F. Clark. 1986. Molecular basis of rotavirus virulence: role of gene segment 4. *J. Virol.* 57:46-49.
31. Prasad, B. V., G. J. Wang, J. P. Clerx and W. Chiu. 1988. Three-dimensional structure of rotavirus. *J. Mol. Biol.* 199:269-275.
32. Prasad, B. V. V., R. Rothnagel, A. Shaw, Q. Y. Zeng, D. Chen, J. Cohen, M. K. Estes, R. F. Ramig and W. Chiu. 1992. Three-dimensional structural studies on rotavirus, abstr. S1-1, p. 16. Abstr. Fourth International Symposium on Double-Stranded RNA Viruses. 1992.
33. Ruggeri, F. M. and H. B. Greenberg. 1991. Antibodies to the trypsin cleavage peptide VP8 neutralize rotavirus by inhibiting binding of virions to target cells in culture. *J. Virol.* 65:2211-2219.
34. Sabara, M., J. E. Gilchrist, G. R. Hudson and L. A. Babiuk. 1985. Preliminary characterization of an epitope involved in neutralization and cell attachment that is located on the major bovine rotavirus glycoprotein. *J. Virol.* 53:58-66.

35. Srnka, C. A., M. Tiemeyer, J. H. Gilbert, M. Moreland, H. Schweingruber, B. W. De Lappe, P. G. James, T. Gant, R. E. Willoughby, R. H. Yolken, M. A. Nashed, S. A. Abbas and R. A. Laine. 1992. Cell surface ligands for rotavirus: mouse intestinal glycolipids and synthetic carbohydrate analogs. *Virology* 190:794-805.
36. Superti, F. and G. Donelli. 1991. Gangliosides as binding sites in SA-11 rotavirus infection of LLC-MK2 cells. *J. Gen. Virol.* 72:2467-2474.
37. Taniguchi, K., W. L. Maloy, K. Nishikawa, K. Y. Green, Y. Hoshino, S. Urasawa, A. Z. Kapikian, R. M. Chanock and M. Gorziglia. 1988. Identification of cross-reactive and serotype 2-specific neutralization epitopes on VP3 of human rotavirus. *J. Virol.* 62:2421-2426.
38. Truneh, A., D. Buck, D. R. Cassat, R. Juszczak, S. Kassis, S.-E. Ryu, D. Healey, R. Sweet and Q. Sattentau. 1991. A region in domain 1 of CD4 distinct from the primary gp120 binding site is involved in HIV infection and virus-mediated fusion. *J. Biol. Chem.* 266:5942-5948.
39. Willoughby, R. E. and R. H. Yolken. 1990. SA11 rotavirus is specifically inhibited by an acetylated sialic acid. *J. Infect. Dis.* 161:116-119.
40. Willoughby, R. E., R. H. Yolken and R. L. Schnaar. 1990. Rotaviruses specifically bind to the neutral glycosphingolipid asialo-GM1. *J. Virol.* 64:4830-4835.

41. Yolken, R. H., R. Willoughby, S. B. Wee, R. Miskuff and S. Vonderfecht. 1987. Sialic acid glycoproteins inhibit in vitro and in vivo replication of rotaviruses. J. Clin. Invest. 79:148-154.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Effect of neuraminidase treatment of MA104 cells on the infectivity of wild type and nar mutant viruses. MA104 cells were treated with the indicated concentrations of neuraminidase from *Arthrobacter ureafaciens*, for 1 hr at 37°C, and were subsequently infected with approximately 500 ffu of the corresponding virus. After incubation at 37°C for 14-16 h, the cells were stained by an immunoperoxidase assay as described in materials and methods. The infectivity of the viruses is expressed as the percentage of the ffu observed in untreated cells infected with the same virus strain. The nar1 and SA114S infectivities were assayed in a separate experiment.

Figure 2. Effect of glycoporphin A on the infectivity of wild type and gpr mutant viruses. Approximately 500 ffu of virus were incubated with the indicated concentrations of gphA, for 1 h at 4°C, and then used to infect MA104 cells. The virus was adsorbed at 4°C for 1 h, and the infected cells were then incubated at 37°C for 14-16 h. After this time, the cells were fixed and stained by an immunoperoxidase assay as described in materials and methods. The infectivity of the viruses is expressed as the percentage of ffu observed in cells infected with the same virus strain, in the absence of glycoporphin A. The gpr1, gpr3, gpr32 and gpr41 infectivities were assayed in a separate experiment.

Figure 3. Effect of neuraminidase treatment of MA104 cells on the infectivity of wild type and gpr mutant viruses. The conditions are the same as described in the legend of Figure 1.

Figure 4. Effect of neuraminidase treatment of MA104 cells on the infectivity of reassortant viruses obtained by coinfection with gpr8 or gpr34 viruses and SA114S. The conditions are the same as described in the legend of Figure 1. Reassortant viruses are named as 8- and 34-, to indicate the parental mutant, gpr8 or gpr34, used in the coinfection with SA11.

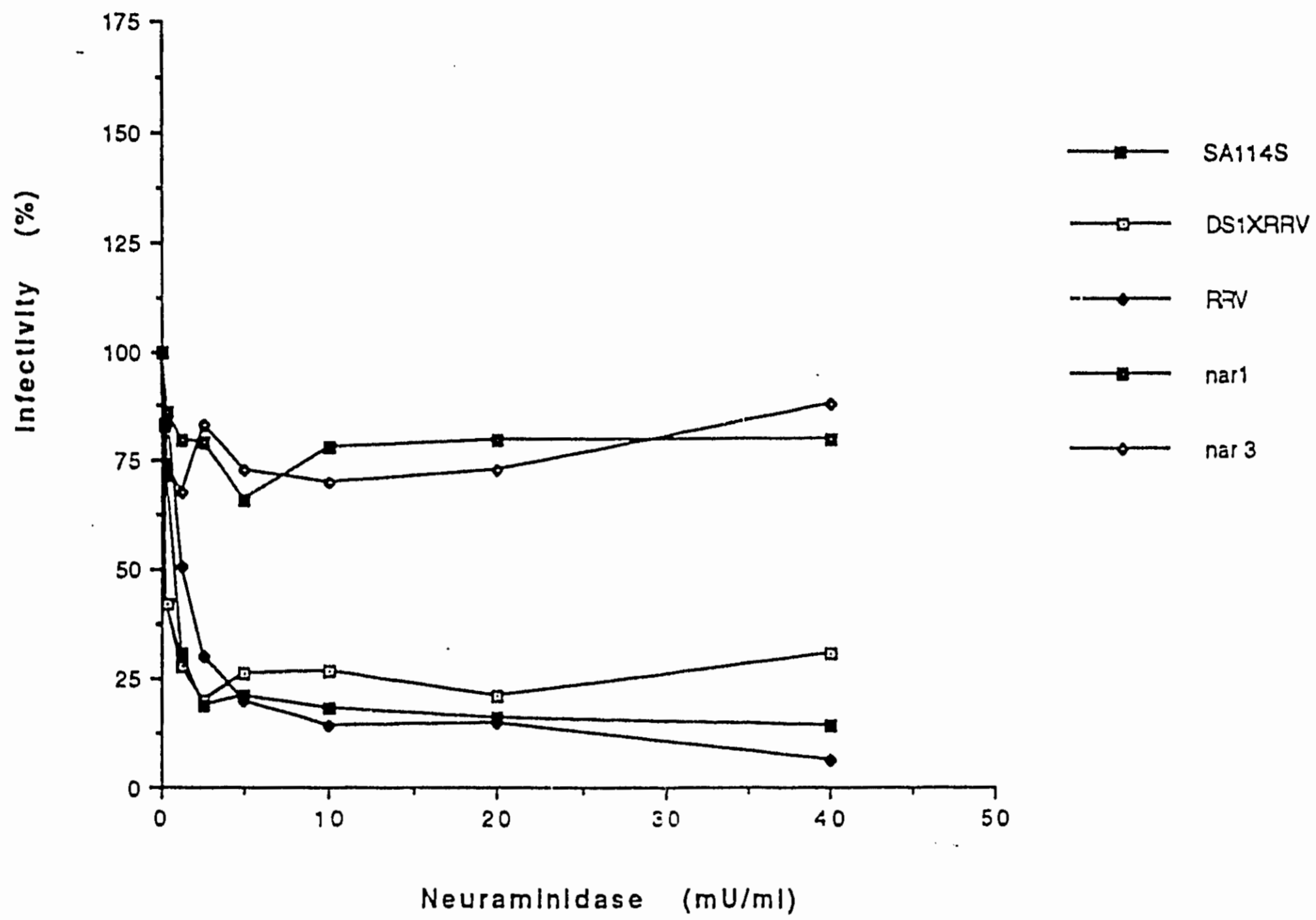


Figure 1

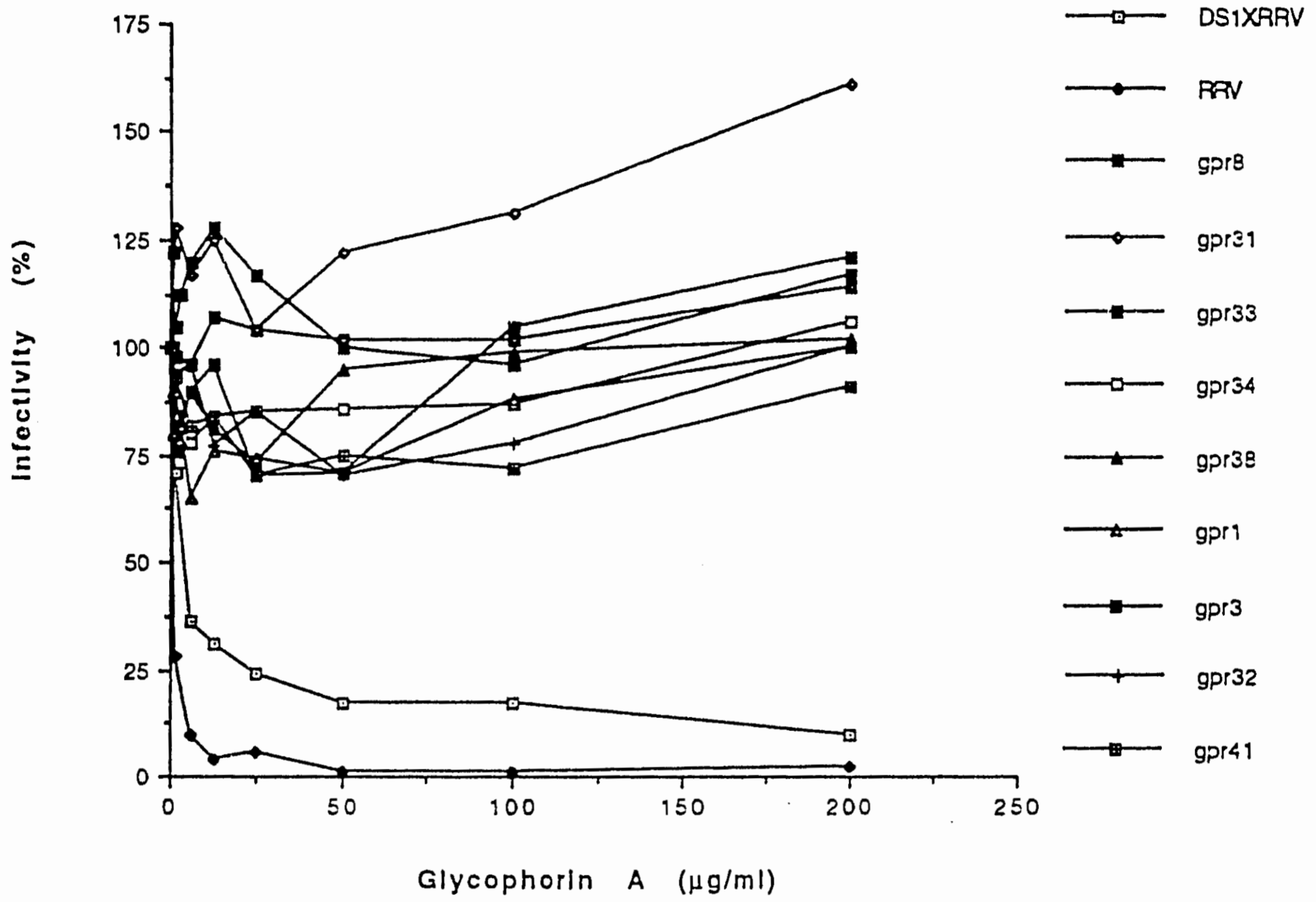


Figure 2

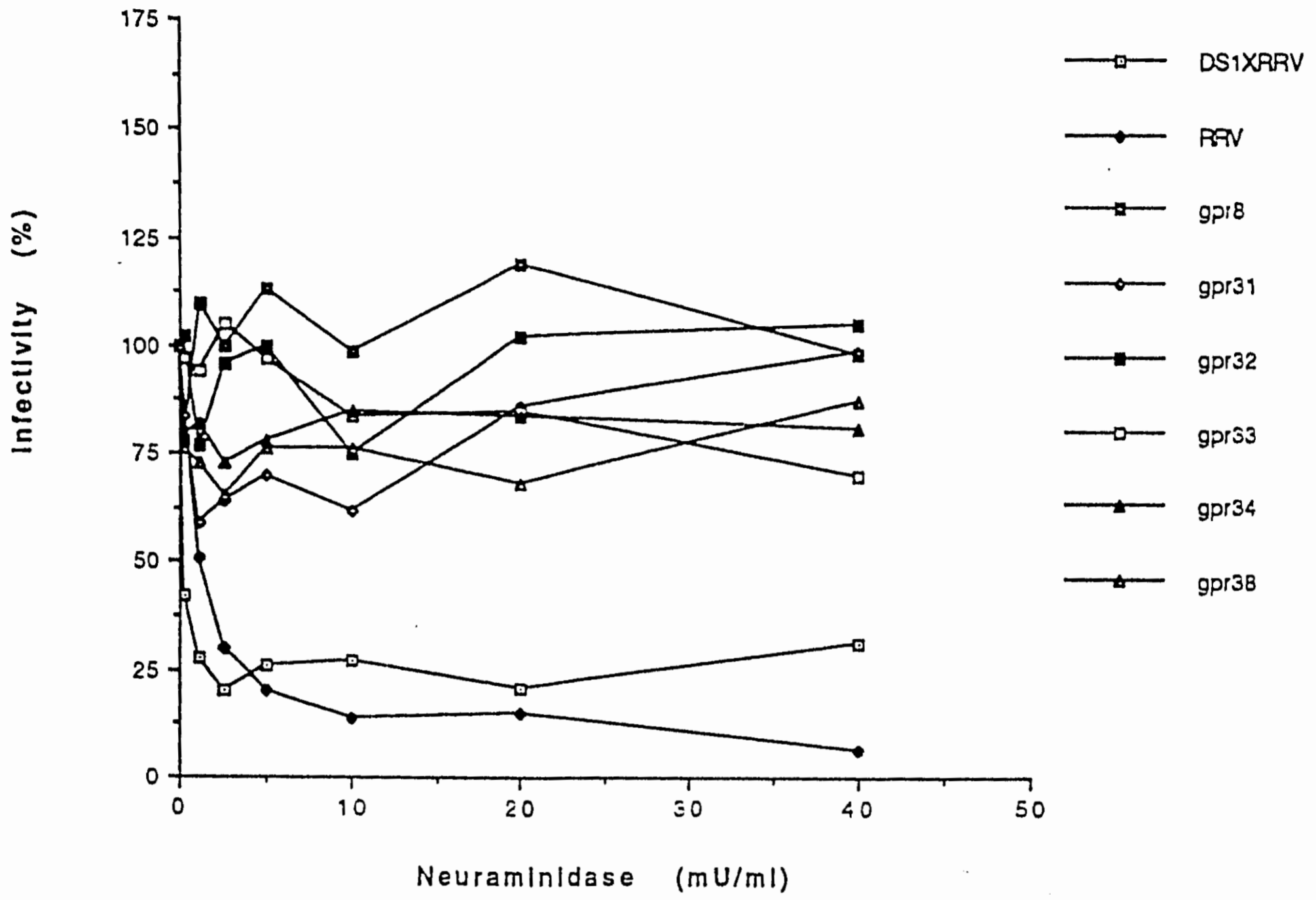


Figure 3

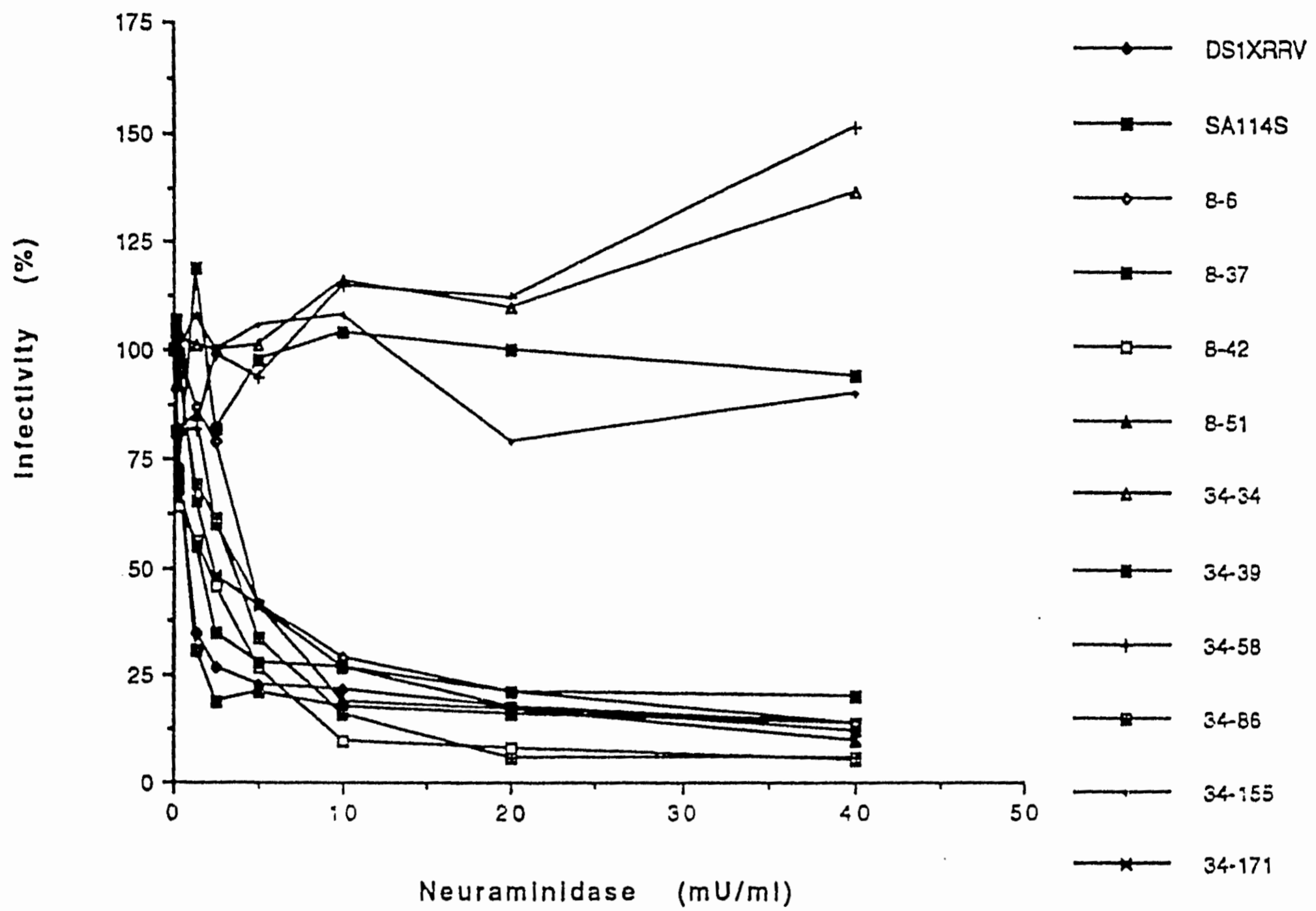


Figure 4

Table 1. Genotype and neuraminidase resistance of reassortant rotaviruses generated by coinfection with gpr8 or gpr34 mutants and SA114S.

Reassortant [§]	Parental origin of segment [*]		Neuraminidase resistance
	gpr8 or gpr34	SA114S	
8-6	7	1,2,3,4,5,6,7,8,10,11	-
8-37	1,3,4,5,7,9,10,11	2,6,8	+
8-42 [@]	3,5,6,7,10,11	1,2,4	-
8-51	1,2,3,5,6,7,10,11	4,7,8	-
34-9	6,7,9,10	1,2,3,4,5,8,11	-
34-34	4,6,7,9,10	1,2,3,5,8,11	+
34-39	6,7,8	1,2,3,4,5,7,10,11	-
34-58 [@]	1,4,6,7,10	2,3,5,11	+
34-63	4,7,8,9,10,11	1,2,3,5,6,	+
34-86	7,8,9,10	1,2,3,4,5,6,11	-
34-133	4,6,10	1,2,3,5,7,8,9,11	+
34-155	4,7,10	1,2,3,5,6,7,8,11	+
34-171	6,7,10	1,2,3,4,5,7,8,11	-

*Determined by electropherotype and hybridization. In the gpr mutants, the segments 7, 8 and 9 code for VP7, NS35 and NS34, respectively. In the SA114S strain, proteins VP7, NS35 and NS34 are coded by segments 9, 8 and 7, respectively.

§ Named as 8- or 34-, depending on the mutant, gpr8 or gpr34, which was used in the coinfection with SA114S.

@ The parental RNA segments coding for NS34 and NS35 could not be assigned.

Table 2. Reactivity of VP4 and VP7 neutralizing mAbs with the nar and gpr mutants and wild type viruses by a HA inhibition assay.

VIRUS	Monoclonal antibodies							Anti-RRV&
	VP8		VP5		VP7#			
	M11 (87)*	1A9 (100)	M14 (148)	7A12 (188)	2G4 (393)	S2-2G10 (190)	4F8 (96)	
nar3	2,000†	32,000	8,000	16,000	16,000	<2,000	64,000	16,000
gpr8	2,000	16,000	8,000	16,000	16,000	<2,000	64,000	16,000
gpr34	2,000	16,000	16,000	16,000	16,000	<2,000	64,000	32,000
gpr38	2,000	16,000	8,000	16,000	16,000	<2,000	64,000	16,000
RRV	500	16,000	8,000	8,000	8,000	<2,000	16,000	4,000
DS1XRRV	1,000	16,000	16,000	16,000	32,000	64,000	<2,000	1,000

†Values shown are the HA inhibition titers, expressed as the reciprocal of the highest dilution of the mAb that completely inhibited the hemagglutination of four HA units of the indicated virus.

* In parenthesis is the number of the aminoacid changed in VP4 or VP7, that allow the viruses to escape neutralization by the indicated mAbs, as reported by Mackow et al.(25) and Green et al. (15).

& Rabbit hyperimmune serum to simian rotavirus RRV strain.

#MAb S2-2G10 recognizes serotype G2 strains; mAb 4F8 has a serotype G3 specificity

Table 3. Neutralization titers of mAbs to VP4 and VP7 for nar and gpr mutants and wild type viruses on NA-treated and untreated cells.

VIRUS	Monoclonal antibodies							Anti-RRV§	
	VP8		VP5		VP7#				
	M11 (87)&	1A9 (100)	M14 (148)	7A12 (188)	2G4 (393)	S22G10 (190)	4F8 (96)		
NA-treated cells*	nar3	<100	<100	<100	<100	3200	<100	12800	25600
	gpr8	<100	<100	100	<100	3200	<100	12800	25600
	gpr34	<100	<100	400	<100	3200	<100	12800	12800
	gpr38	<100	<100	200	<100	3200	<100	12800	25600
Untreated cells	nar3	100	100	800	400	12800	<100	25600	25600
	gpr8	<100	<100	1600	400	12800	<100	25600	51200
	gpr34	100	800	12800	ND	25600	<100	51200	12800
	gpr38	<100	<100	6400	1600	12800	<100	51200	51200
	RRV	400	12800	12800	3200	12800	<100	51200	25600
	DS1XRRV	800	12800	12800	12800	12800	51200	200	3200

Titers are expressed as the reciprocal of the highest antibody dilution at which at least 60% of the input virus is neutralized.

* MA104 cells were treated with neuraminidase from *Arthrobacter ureafaciens* at 20 mU/ml for 1 hr at 37°C.

& In parenthesis is the aminoacid changed in VP4 or VP7, that allow the viruses to escape neutralization by the indicated mAbs, as reported by Mackow et al.(25) and Green et al. (15).

§ Rabbit hyperimmune serum to simian rotavirus strain RRV.

#MAbs S2-2G10 and 4F8 recognize serotype G2 and G3 strains, respectively

ND, not determined

JVI 361-93

This excellent study builds on previous information in the literature to clarify the role of sialic acid residues as parts of the rotavirus cell attachment structure. The Authors isolate sialic acid binding independent escape mutants of a rhesus rotavirus reassortant and demonstrate that these mutants are not dependent on sialic acid for infectivity and that the mutant phenotype (sialic acid independence) segregates with VP4 by genetic analysis. The Authors go on to take advantage of a previously well characterized library of neutralizing monoclonals to rhesus rotavirus VP4 in order to demonstrate that the sialic acid escape mutants continue to be bound by VP8 specific neutralizing monoclonals but are no longer neutralized. The Authors interpret this observation as indicating that the variants are now able to bind to permissive cells by an alternative attachment mechanism independent of sialic acid. The paper is important and deserves thoughtful attention from workers in the field. However, certain areas of this study could be greatly improved by simple clarifications and in some areas additional experimental data is required to support the conclusions. [1] It is not clear how many separate experiments were carried out to isolate the nar and gphA mutants. Did all gphA mutants come from a single multiply passaged pool or were several independent pools produced and used to isolate mutants? Were only 9 of 50 clones tested for gphA resistance or were all 50 tested and 41 were still gphA sensitive? Similar clarifications should also be included for the nar variants. [2] On Page 9, the second paragraph is confusing. Do the 6th genes of RRV and the DS1 x RRV reassortant co-migrate on PAGE? Are the changes in VP6 in the DS1 x RRV reassortant felt to represent amino acid changes acquired during passage in Ma104 cells or does the reassortant have an entire 6:h gene derived from a virus other than RRV? Can the reassortant containing only gene 5 of DS-1 be isolated from the original stock by simple Ma104 cell passage or does it only emerge under nar or gphA pressure? The answer to these questions would also help clarify the discussion on page 12, first paragraph. [3] Page 10, first paragraph. The Authors state that the mutants had equal HA activity to the RRV and DS1 x RRV parental strains but no details are given to describe this comparison. Specifically, to what was the HA activity in each preparation standardized? Is it based on and standardized to PFU per ml of the pool, or particle count per ml of the pool, or some other standard? [4] The binding activity of the VP4 specific monoclonals to the nar and gphA mutants is compared by Elisa (Table 2). This data is interpreted as indicating that the mutants bind antibody as efficiently as the parental strain. However, it is not clear how this assay was standardized and it is not clear whether the Elisa O.D. values can be quantitatively compared to each other. Were equal amounts of virus used for each strain? Was the amount added in Elisa based on plaque titer or HA units of the pool? While the binding to MAb 2G4 looks very similar between RRV and the mutants, the binding of the VP8 MAbs appears, in some cases, to be greater for the mutants than for RRV (8pr 34 and 38, for example). The data in Table 2 needs to be better standardized. Also, it would be much more accurate and quantitative to titer the HI activity of the various monoclonals against the mutants and parental strains using a standardized number of HA units in order to clearly demonstrate that the mutants do not bind the monoclonals differently than the parental strains. This type of HI experiment would provide more quantitative data than the current Elisa data in Table 2. Quantitative, not qualitative, binding data of the VP4 MAbs to the mutants and parental strains is needed to compare with the quantitative neutralization data in Table 3. [5] The work cited on Page 13 (Reference #3) has appeared as a full publication and should be so cited. [6] The Authors do not explain why they could not isolate variants from an RRV preparation but could isolate variants from an RRV x DS1 reassortant containing only gene 5 from DS1. Since gene 5 encodes a non-structural protein, it is difficult to see how this gene product could influence VP4 specifically. This perplexing result needs some discussion or explanation.

Review of JVI 361-93

General Comments:

#2
This paper reports the results of experiments that characterized rotavirus mutants that no longer require the presence of sialic acids on the cell surface for infectivity. The results are clear and they indicate there is a second site on VP4, probably on VP5*, required for interactions with the cell. These results explain many discrepancies in the rotavirus literature about differences in infection phenotypes of animal and human rotaviruses and they have important implications for identification of the cellular receptor for rotavirus.

Specific Comments:

1. These studies are a little complicated by the fact that the phenotypes of the mutants were different from the parental reassortant virus. The authors handled the discussion of this clearly although others may simply argue that contamination occurred within the laboratory. This isn't really an issue as long as the final phenotypes of the mutants are correct.

Answer to referee's comments

Referee No. 1

1. All gpr mutants came from a single multiply passaged virus pool. We tested about 50 clones for gphA resistance and only nine of these clones were resistant, the other clones were still gphA sensitive. The same was true for the nar mutants, only two out of 50 clones, isolated from a single pool of virus, turned out to be resistant to neuraminidase treatment of the cells, but we tested all 50 clones. These points have been clarified in the paper.

2. The last part of the second paragraph on page 9 has been modified to include the clarifications suggested. It reads as follows: "....., and we found that the VP6 of RRV migrated by PAGE evidently faster than the VP6 from all other strains, including the DS1XRRV virus (data not shown). The difference in migration between the VP6 proteins of RRV and the DS1XRRV reassortant probably represents amino acid changes acquired by either virus during passage in MA104 cells, since as mentioned in Material and Methods, the DS1XRRV VP6 gene was shown to be derived from the RRV parent by hybridization analysis. The reassortant virus containing only gene 5 of DS1 could not be detected, by genomic RNA electrophoresis analysis, in more than one hundred plaques analyzed from the original DS1XRRV virus stock passaged in the absence of NA or gphA pressure".

3. The HA activity of each virus was standardized to focus forming units/ml. This fact has been mentioned in the "HA and HA inhibition assays" section of Material and Methods.

4. As suggested by the referee, Table 2, containing the ELISA data on the binding activity of the VP4 specific monoclonals to the nar and gpr mutants, has been deleted. It has been replaced by a table showing the HAI activity of the various monoclonals against the mutants and parental strains. The HAI assay was performed using 4 HA units of each virus (indicated in Material and Methods). After performing the HAI assay, the conclusions were the same as those obtained with the ELISA assay: the mutants bind the VP4 specific monoclonals essentially as efficiently as the parental viruses.

5. The work cited in reference # 3 has been cited as a full publication.

6. We have no good explanation for the fact that the mutant viruses were isolated from a reassortant DS1XRRV virus containing only gene 5 from DS1, and not from wild type RRV. However, as discussed in the paper, this is not the only difference between the mutants and RRV, since the VP6 proteins of these strains have a different electrophoretic mobility and thus they must have some amino acid changes. In addition, the fact that we did not isolate mutants from 50 plaques analyzed from the RRV wild type virus, after passage under selective pressure, does not indicate that mutants can not be isolated from RRV.

Referee No. 2

We agree with the referee's comment, and we are sure that the final phenotype (sialic acid independence) of the mutants is correct.

b. RESULTADOS ADICIONALES.

Las cepas de rotavirus aisladas de humanos y animales difieren por su necesidad de ácidos siálicos en la célula huésped para iniciar la infección. Así, la infectividad de los rotavirus animales decae notablemente cuando la infección se realiza sobre células que han sido previamente tratadas con neuraminidasas; por el contrario, la infectividad de cepas aisladas de humanos no disminuye sino que, en algunos casos, parece aumentar ligeramente. En la Figura 5 se muestra el comportamiento de tres cepas de rotavirus de origen humano (Wa, DS1 y ST3) y de tres cepas de rotavirus animal (SA11, RRV y YM). La infectividad del virus rearreglante DS1XRRV, que posee los genes 5 y 8 de DS1 (de origen humano), que codifican para las proteínas NS53 y VP7, respectivamente, y el resto de los genes de una cepa de origen animal (RRV), fué similar a la infectividad de la cepa animal RRV en células tratadas con neuraminidasa. El comportamiento de todas estas cepas de rotavirus, humanos y animales, en presencia de una glicoproteína con alto contenido de ácidos siálicos, la glicoforina A (gphA), fué muy similar al comportamiento que tienen en células tratadas con NA, cuando se utilizaron concentraciones de gphA menores de 200 ug/ml (Figura 2 del artículo).

Con el fin de estudiar las moléculas que intervienen en los primeros estadios de la infección siálico-dependiente por rotavirus, se seleccionaron variantes de la cepa RRV y del virus rearreglante DS1XRRV, cuya infectividad fuera insensible al tratamiento de las células con neuraminidasas y a la presencia de gphA. Las variantes se denominaron nar, cuando fueron seleccionadas a partir de células tratadas con neuraminidasa, y gpr, cuando se seleccionaron en presencia de gphA. Todas estas variantes han sido descritas en el artículo anexo.

Como también se menciona en el artículo anexo, encontré mutantes resistentes a gphA y al tratamiento con neuraminidasa a partir del virus DS1XRRV y no a partir de la cepa RRV. Por el análisis de las variantes por electroferotipo (Figura 6), hibridización (Figura 7) y reactividad con Mabs por ELISA (Tabla 4) e inhibición de la hemaglutinación (Tabla 2 del artículo), encontré que estas variantes contenían todos los genes de la cepa RRV, excepto el segmento 5 que codifica para la proteína NS53, que provenía de la cepa DS1.

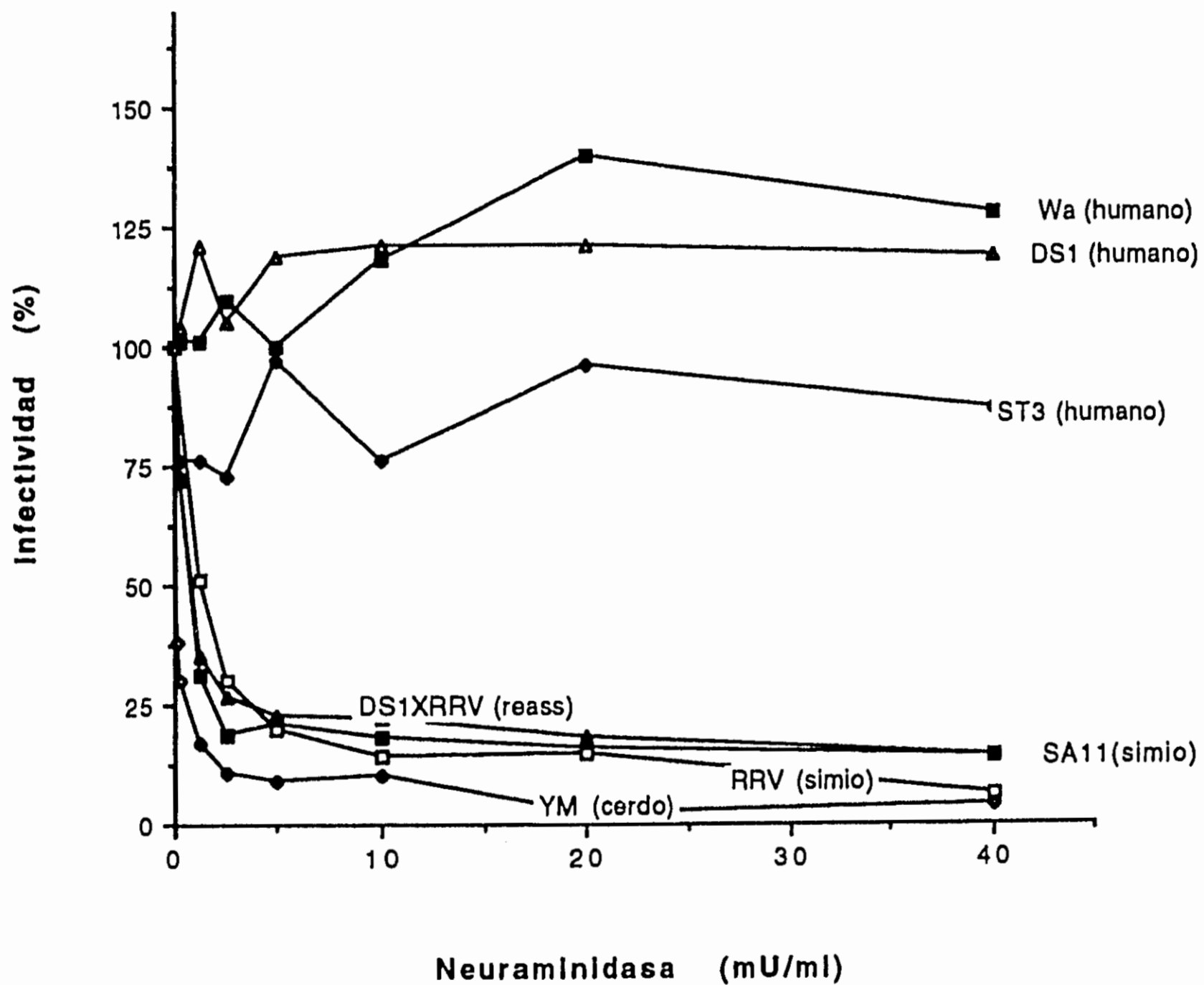


FIGURA 5. Efecto del tratamiento de la neuraminidasa de *A. ureafaciens* en células MA104 sobre la infectividad de cepas de rotavirus. Las células Ma104 crecidas en placas de cultivo de 96 pozos fueron tratadas 1 hr a 37 C con las cantidades señaladas de neuraminidasa de *A. ureafaciens*; posteriormente fueron infectadas con una cantidad conocida de virus, adsorbido durante una hora a 37 C; el inóculo fue removido y las células incubadas por 12-14 hrs a 37 C. Las células infectadas se detectaron por tinción con inmunoperoxidasa. Los datos se expresan como el porcentaje de las células infectadas con respecto a la infección realizada en células sin tratamiento alguno. Reass= virus rearreglante, ver texto.

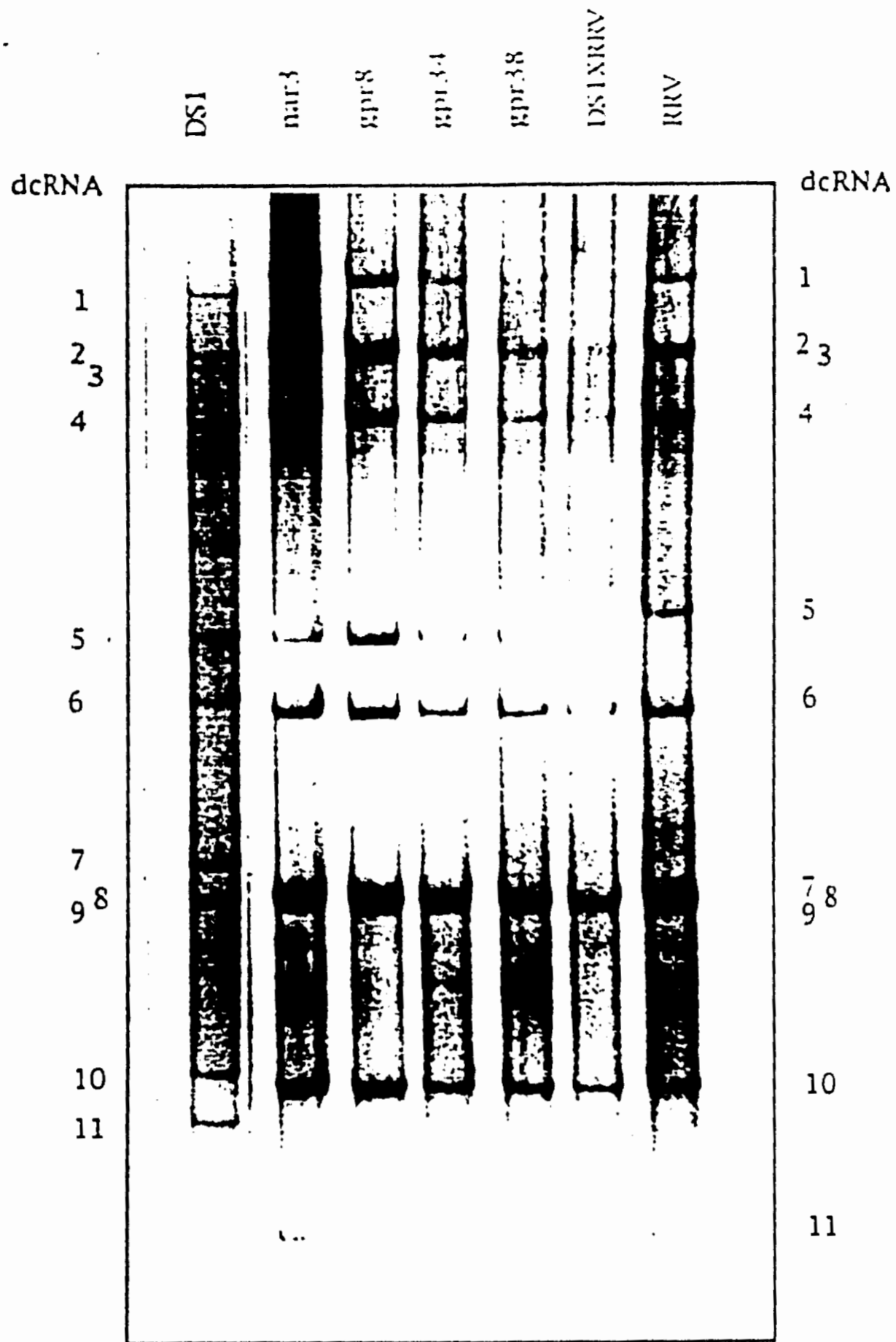


FIGURA 6. Electroferotipo de las variantes nar y gpr. El RNA genómico se extrajo, a partir de lisados de células infectadas con los virus mencionados, utilizando fenol, cloroformo y precipitando con etanol. El dcRNA se separó por electroforesis en geles de poliacrilamida con el sistema de Laemmli sin SDS y se tiñó con nitrato de plata. Los segmentos de dcRNA están indicados en orden progresivo de acuerdo a su migración.

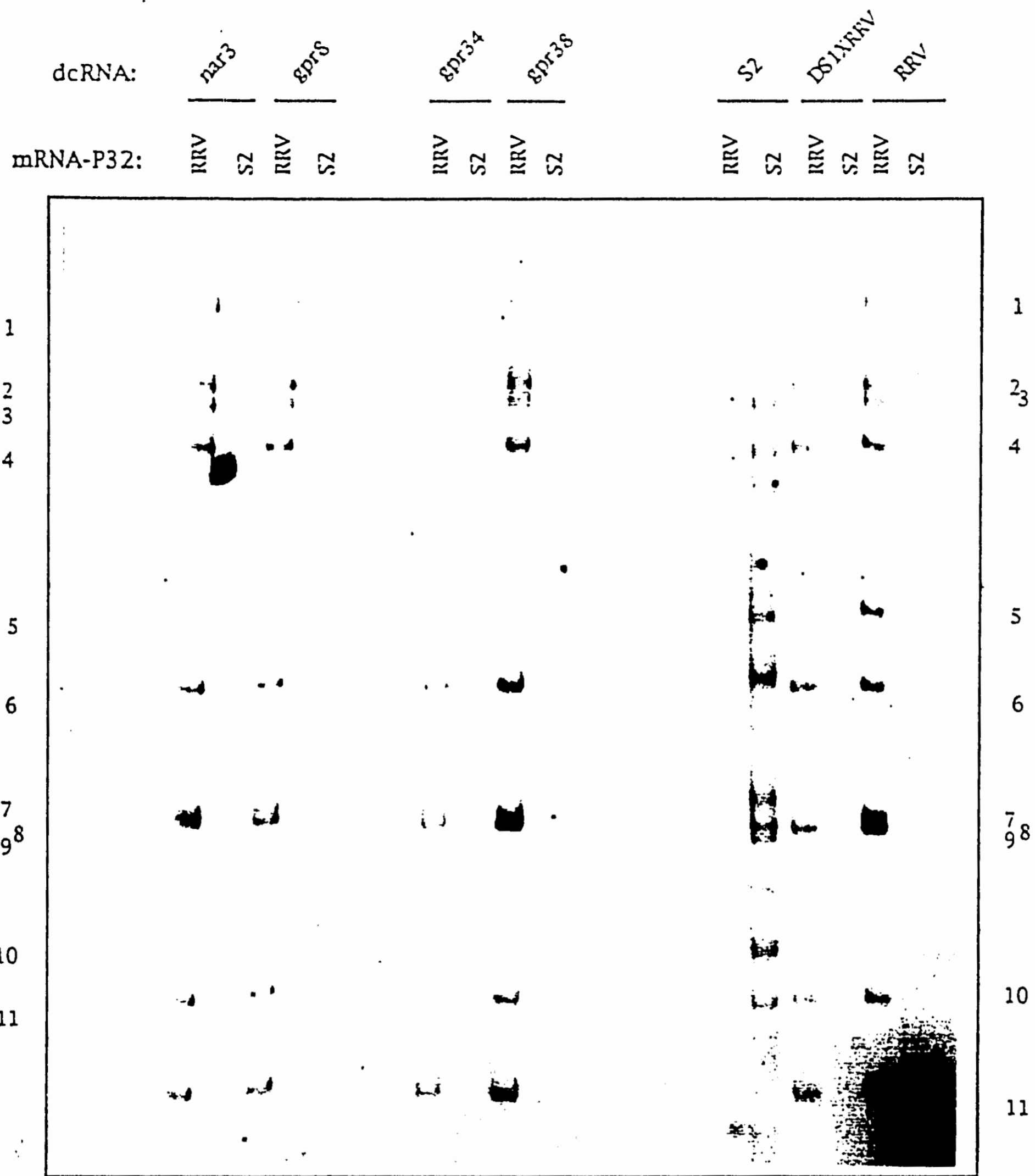


FIGURA 7. Hibridización RNA-RNA de variantes nar y gpr. RNA genómico de virus purificado se extrajo con fenol-cloroformo y se precipitó con etanol. Este RNA se hibridizó, en solución durante 14 -16 hrs a 65°C, con mRNA-P³² producido in vitro, de las cepas RRV y S2 (genotipo similar a la cepa DS1). Los híbridos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida con el sistema de Laemmli. Los segmentos de dcRNA están numerados.

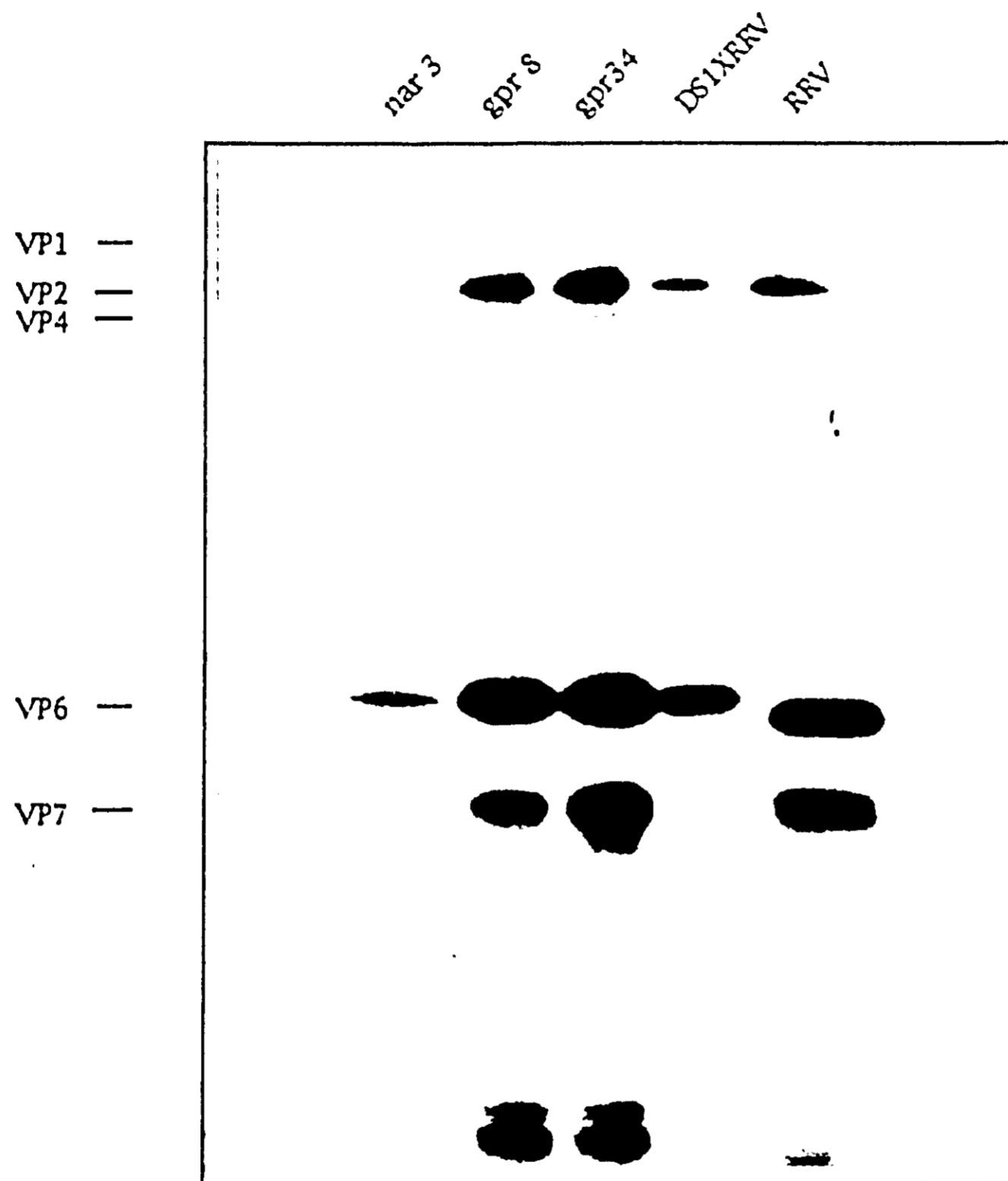


FIGURA 8. Proteínas virales de las variantes nar y gpr. Virus marcados metabólicamente con Met-S³⁵ se purificaron por gradientes de CsCl y las proteínas virales señaladas se separaron por SDS-PAGE.

Tabla 4. Reactividad de anticuerpos monoclonales neutralizantes con las variantes nar y gpr y virus silvestres, por ELISA.

VIRUS	Anticuerpos monoclonales									Anti-YM&
	VP8				VP5		VP7#			
	M11 (87)*	1A9 (100)	M14 (148)	7A12 (188)	2G4 (393)	2F1 (?)	S2-2G10 (190)	4F8 (96)	159 (94)	
nar3	2.07	2.72	>3.00	2.15	0.67	0.05	0.07	>3.00	>3.00	0.89
gpr8	1.90	2.05	2.50	1.88	0.70	0.10	0.07	>3.00	>3.00	1.13
gpr34	2.22	2.82	3.00	2.39	0.65	0.03	0.08	>3.00	>3.00	0.91
gpr38	1.96	2.22	2.49	1.72	0.68	0.00	0.05	>3.00	>3.00	0.88
RRV	1.19	1.57	2.02	1.62	0.71	0.00	0.08	>3.00	>3.00	0.60
DS1XRRV	0.15	0.38	0.68	0.69	0.67	0.38	0.81	0.00	0.00	0.83
DS1	0.00	0.00	0.00	0.00	ND	0.72	ND	0.00	0.00	0.65

Los valores representan la densidad optica a 405 nm.

* En parentesis, esta el numero de aminoacido cambiado en, VP4 o VP7, que contienen virus que escapan a la neutralizacion por los Mabs indicados, como ha sido reportado por Mackow et al.() y Green et al. ().

& Sueri hiperinmune de raton contra la cepa de rotavirus de cerdo YM

#Mabs 2F1 y S2-2G10 reconocen cepas de serotipo G2; mAbs 4F8 y 159 tienen una especificidad de serotipo G3 ND, no determinado.

Por su reactividad con Mabs neutralizantes en ensayos de ELISA e inhibición de la hemaglutinación, no se apreciaron diferencias claras entre la cepa RRV y las variantes nar y gpr, es decir todos los mabs contra VP4 y VP7 de RRV reaccionaron tanto con la cepa RRV como con las variantes. En cambio, sí hubo diferencia entre la reactividad de los Mabs con las variantes y con el virus del que se aislaron, DS1XRRV. Estas diferencias se detectaron en VP7, ya que los Mabs S2-2G10 y 2F1, que reconocen VP7 tipo G2 de la cepa humana DS1 (17, 41), reaccionaron con DS1XRRV y no con las variantes; mientras que los Mabs que reconocen VP7 tipo G3 de RRV (159 y 4F8) (41), sí reaccionaron con las variantes pero no con el virus rearreglante DS1XRRV.

La explicación más probable para estas observaciones es que el virus DS1XRRV, del que se partió para aislar las variantes, era una población heterogénea de virus, en la que estaban presentes los genes que codifican para VP7 de RRV y de DS1. Esta conclusión se reforzó por el hecho de que todas las mutantes, al igual que el virus DS1XRRV, contenían una VP6 que se diferencia de la VP6 de RRV, por migración en gel (Figura 8), a pesar de que por hibridación (Figura 7), no se detectaron cambios entre los genes que las codifican.

Las mutantes nar y gpr fueron aisladas en células MA104, derivadas de riñón de mono rhesus, que han sido ampliamente utilizadas para el estudio de los rotavirus porque son permisibles para cepas virales aisladas de distintos orígenes. Para determinar si la infectividad de las variantes nar y gpr y otras cepas de rotavirus era similar en distintas líneas celulares tratadas con neuraminidasa y establecer relaciones entre la infección por rotavirus en estas líneas celulares, se decidió determinar el comportamiento de estos virus en las células LLCMK2 y CV1 (ambas derivadas de riñón de mono), previamente tratadas con neuraminidasa.

La infectividad de las mutantes continuó siendo resistente, aunque en diferente grado, al tratamiento de las células CV1 (Figura 9) y LLCMK2 (Figura 10) con neuraminidasa. El comportamiento de las variantes nar y gpr fué similar en las tres líneas celulares, incluyendo MA104, independientemente de que se utilizara la neuraminidasa derivada de *Arthrobacter ureafaciens* o de *Vibrio cholerae*, las cuales difieren ligeramente en la especificidad de sustrato (58). La infectividad de dos cepas de rotavirus aisladas del mismo origen (SA11 y RRV aisladas de simio), presentaron diferente grado de sensibilidad al tratamiento con neuraminidasa: la cepa RRV fue muy sensible en células CV1 (Figura 9), de manera que a concentraciones de 2.5 mU/ml se inhibió casi el 90% de la infectividad, mientras que en las células LLCMK2, esta

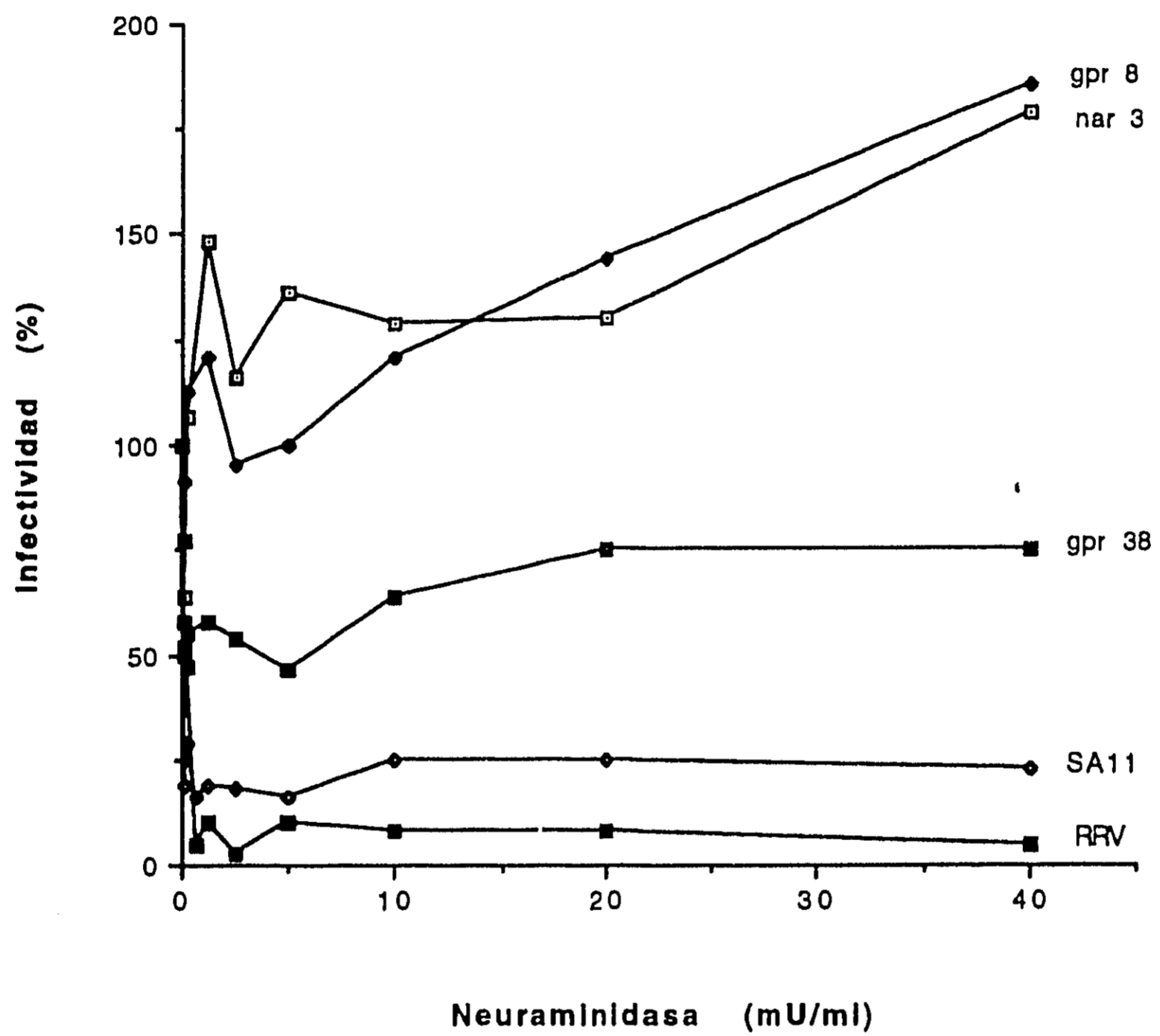


FIGURA 9. Efecto del tratamiento de la neuraminidasa de *A. ureafaciens* en células CV1 sobre la infectividad de las variantes nar y gpr. Condiciones similares a las descritas en la figura 5, pero en células CV1.

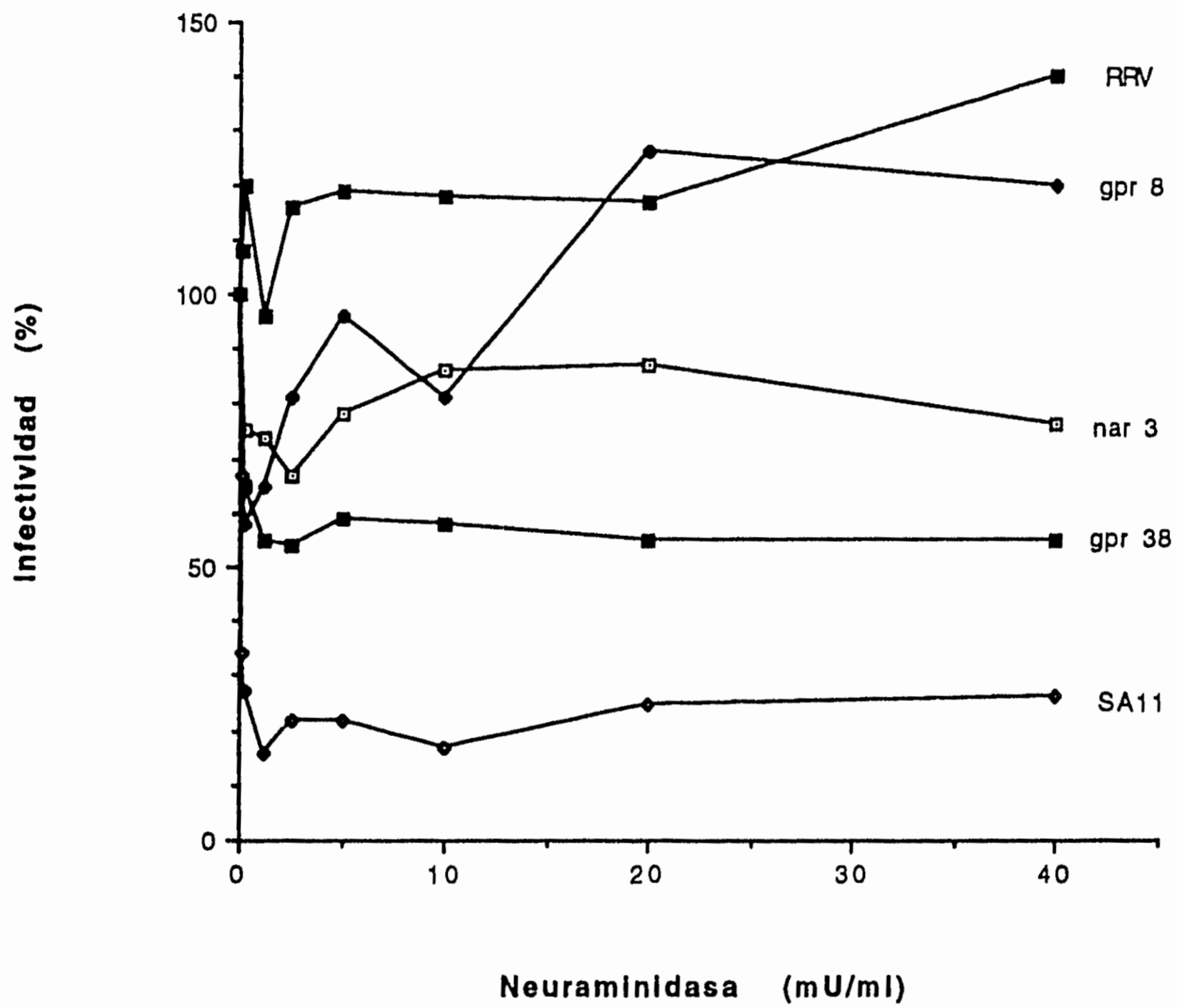


FIGURA 10. Efecto del tratamiento de la neuraminidasa de *A. ureafaciens* en células LLCMK2 sobre la infectividad de las variantes nar y gpr. Condiciones similares a las descritas en la figura 5, pero en células LLCMK2.

infectividad casi no se afectó (Figura 10). Por otro lado, el comportamiento de la cepa SA11 fué similar en las dos líneas celulares.

El hecho de que la cepa RRV sea susceptible al tratamiento con NA en una línea celular (CV1), y no en otra (LLCMK2), sugiere que una misma cepa de rotavirus puede reconocer dos entidades celulares diferentes durante la adsorción, solo una de las cuales contiene residuos de ácido siálico; también cabe la posibilidad de que la(s) molécula(s) que reconoce RRV sea la misma en las dos líneas celulares pero que en LLCMK2 sea más abundante, de manera que las concentraciones de neuraminidasa utilizadas no son suficientes para eliminar estas moléculas de la superficie y, por lo tanto, no se aprecia su efecto sobre la infectividad de RRV.

Los datos que existen respecto a que las cepas humanas de rotavirus no requieren ácidos siálicos para la infección, han sido obtenidos por infecciones en células MA104; sin embargo no se sabe si estas cepas requieran estos residuos cuando infectan otras líneas celulares. Para determinar la necesidad de ácidos siálicos en la infección a otras líneas celulares, por parte de una cepa de rotavirus humano, decidimos evaluar la infectividad de la cepa DS1 en las células LLCMK2 y CV1 tratadas con neuraminidasa. En la Figura 11 se observa que la infectividad de la cepa DS1 se incrementa notablemente, hasta un 225% aproximadamente, en células LLCMK2 y CV1 a concentraciones de neuraminidasa de 20 mU/ml. En células MA104 tratadas con esta enzima, también parece incrementar la infectividad de este virus, pero el efecto no es tan marcado como en las otras células (Figura 5).

Es notable que la cepa de rotavirus humano DS1 incrementa su infectividad en células que carecen o tienen muy pocos residuos de ácido siálico en la superficie, por efecto de la neuraminidasa. En este sentido, parecería que estos residuos entorpecen la adsorción y/o penetración de este virus a la célula, de manera que cuando estos residuos se retiran, la infección se facilita.

Cuando se utilizaron virus rearrreglantes derivados de SA11 y gpr8 o gpr34 (ver el artículo anexo), para determinar su sensibilidad al tratamiento de las células LLCMK2 con neuraminidasa, se observó que todos los virus que contenían el gene 4 de SA11 fueron sensibles al tratamiento en la misma medida que lo fué la cepa SA11, por lo que el gene que codifica para VP4 parece ser también responsable de la sensibilidad a neuraminidasa en este tipo celular (Figura 12).

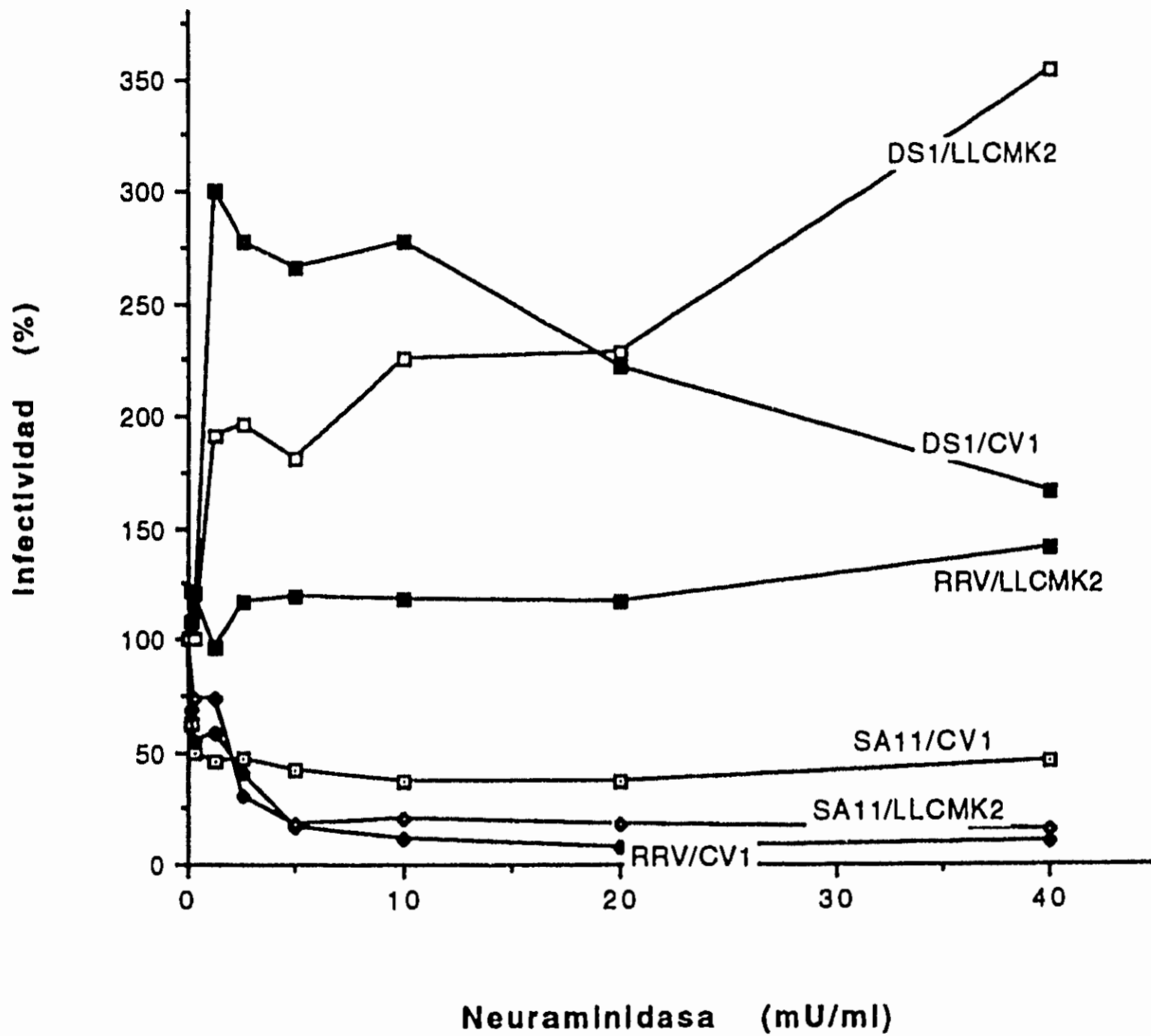


FIGURA 11. Efecto del tratamiento de la neuraminidasa de *A. ureafaciens* en células CV1 y LLCMK2 sobre la infectividad de cepas de rotavirus. Condiciones similares a las descritas en la figura 5.

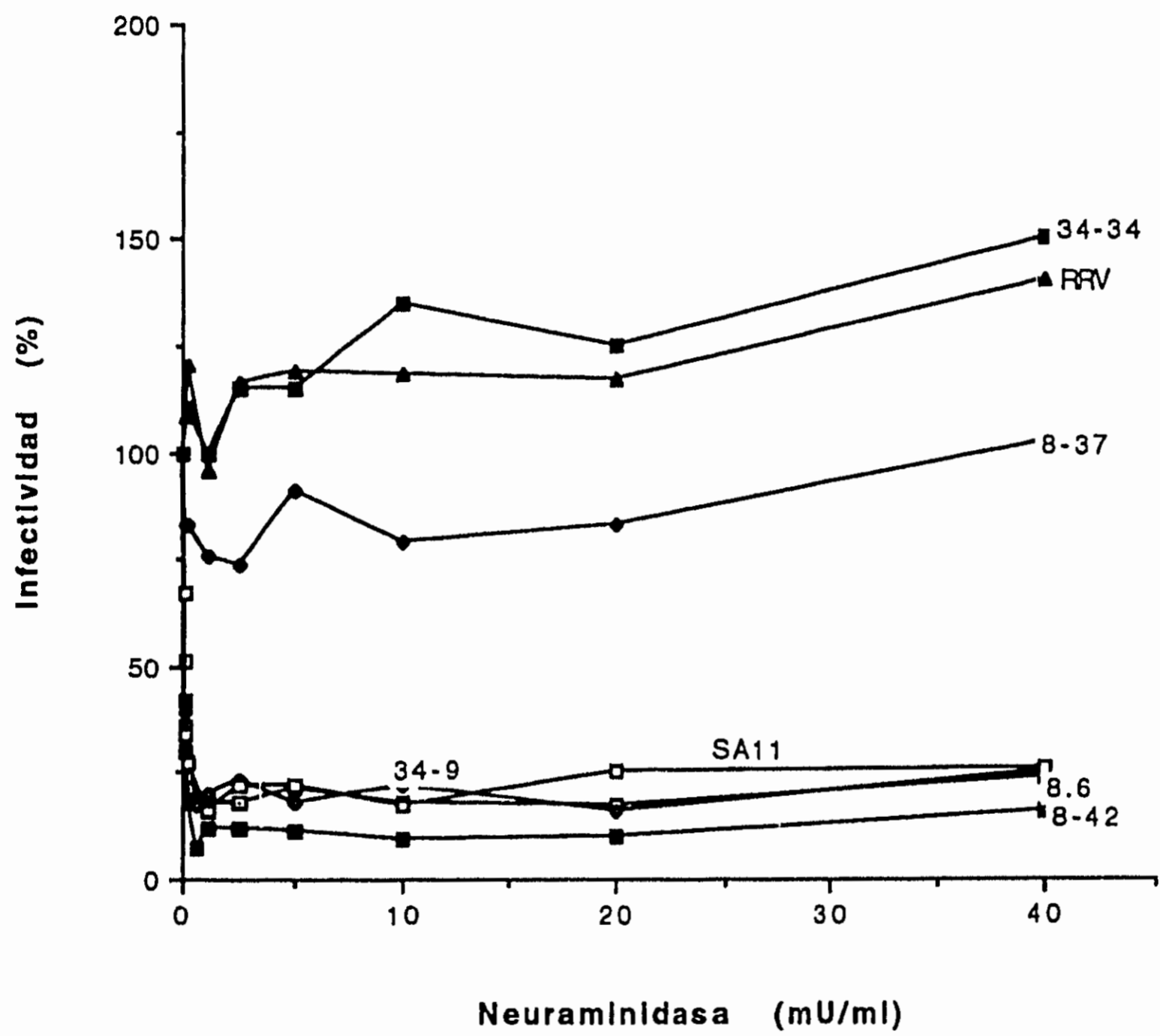


Figura 12. Efecto del tratamiento de la neuraminidasa de *A. ureafaciens* en células LLCMK2 sobre la infectividad de virus rearreglantes obtenidos de la coinfección de gpr8 y gpr34 con SA11.

La interacción del virus polio con su receptor, cuando éste se encuentra sobre la superficie celular, provoca cambios que promueven el desnudamiento y la penetración del virus (45). Así, se quiso determinar si la interacción de los rotavirus RRV y DS1XRRV, con los ácidos siálicos de la gphA en forma soluble podrían promover cambios estructurales en el virión, que, a su vez, provocaran la penetración de éstos a células tratadas con neuraminidasas. Estos rotavirus, preincubados con gphA, presentaron menor infectividad, tanto en células normales (Figura 2 del artículo), como en células previamente tratadas con neuraminidasa (Figura 13), por lo que, aparentemente, la interacción de los rotavirus animales con los ácidos siálicos (gphA), no es suficiente para que se lleven a cabo los cambios necesarios durante la penetración del virus a la célula.

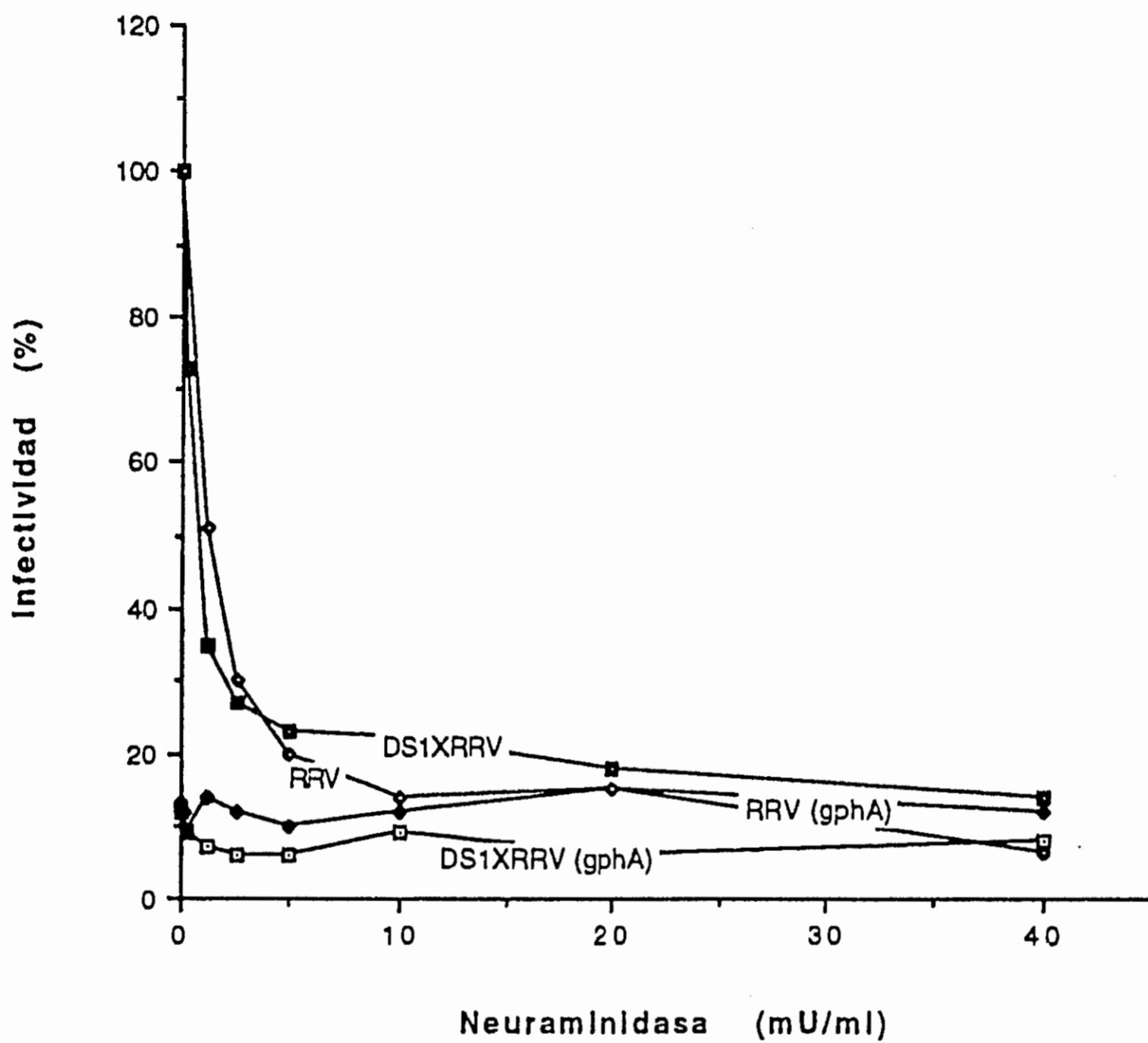


FIGURA 13. Efecto de la glicoforina A sobre la infectividad de rotavirus en células MA104 tratadas con neuraminidasa de *A. ureafaciens*. Las células MA104 crecidas en placas de cultivo de 96 pozos fueron tratadas 1 hr a 37°C con 25 mU/ml de neuraminidasa de *A. ureafaciens*; posteriormente fueron infectadas con una mezcla de 38 μ g de gphA y el virus correspondiente o solamente con el virus, como se describe en el artículo anexo.

DISCUSSION.

En este trabajo se describe el aislamiento de variantes de rotavirus de origen animal que no requieren de residuos de ácido siálico para infectar a su célula huésped; a pesar de este comportamiento, mantienen su capacidad para unirse a estos residuos ya que hemaglutinan de la misma manera que lo hace el virus padre y esta hemaglutinación se inhibe por el tratamiento de los eritrocitos con neuraminidasa y por la presencia de gphA, a concentraciones similares a las que inhiben al virus silvestre.

Todos los Mabs que reaccionan con VP8, en diferentes epítopes, mantienen su reactividad con estas variantes, por lo que el dominio de hemaglutinación en VP4 (localizado entre los aminoácidos 47-247), parece estar conservado, con respecto al virus silvestre. Por otro lado, a pesar de que las variantes nar y gpr se unen a gphA, son capaces de infectar a la célula en su presencia, lo que no puede hacer el virus silvestre. Así, al parecer, la caracterización de estas variantes ha permitido poner de manifiesto que los rotavirus animales pueden hemaglutinar y adsorberse a la célula huésped a través de diferentes dominios de VP4.

Los virus RRV y DS1XRRV se replicaron varias veces en presencia de gphA o en células tratadas con NA; sin embargo, sólo se seleccionaron variantes siálico-independientes a partir del virus rearreglante DS1XRRV. El análisis de las variantes por hibridización y reactividad con Mabs demostró que todas ellas poseían VP7 de RRV; no es claro por qué se seleccionaron estos virus a partir de un virus que, aparentemente, no contenían esta proteína de RRV. Probablemente, los virus que contenían esta VP7 existían en proporciones muy bajas en la población de manera que no se habían detectado, pero que, surgieron bajo las condiciones de selección utilizadas. Es necesario estudiar más a fondo este fenómeno para determinar si existe relación entre la selección de variantes tipo nar y gpr y la presencia de algún otro gene, incluyendo el de VP7.

Existen varios puntos a considerar que pudieron favorecer la selección de variantes de rotavirus animal con el fenotipo de resistencia a neuraminidasa:

1. Las proteínas VP6 del virus DS1XRRV y de las variantes son similares y a la vez, diferentes de la proteína VP6 de RRV, demostrado por su migración en geles de poliacrilamida (FIGURA 6). Se sabe que la proteína VP6 interacciona con VP4 en la partícula viral, por lo tanto, existe la posibilidad de que esta interacción afecte el fenotipo determinado por VP4, tal como ocurre con la interacción de VP7 con VP4.

2. Todas las variantes poseen el gene 5 de la cepa DS1, al igual que DS1XRRV. La influencia de este gene en la selección de las variantes es poco probable porque codifica para una proteína no estructural (NS53) y la evaluación de la siálico-independencia del virus se realiza por un ensayo con la partícula infecciosa, que carece de proteínas no estructurales; de manera adicional, no existen reportes en los que genes que codifican para proteínas no estructurales afecten el fenotipo determinado por las proteínas estructurales de rotavirus.

3. He obtenido la secuencia parcial del gene 4 de cuatro variantes y de los virus RRV y DS1XRRV; en base a ésta, se han detectado cambios entre las dos cepas. Los cambios que se observan en el gene 4 de DS1XRRV con respecto al de RRV podrían estar favoreciendo la obtención de virus con el fenotipo nar y gpr. Así como se han detectado diferencias entre las VP4 de DS1XRRV y RRV, por secuencia, podrían existir variaciones en otros genes, que influyan, aunque no de manera determinante, en la expresión del fenotipo mutante y que no pueden ser detectados por métodos sencillos.

El escape a la neutralización de las variantes nar y gpr con los Mabs anti-VP8, que impiden la adsorción del virus silvestre a células en cultivo (46), implica que la adsorción de las mutantes se realiza a través de un dominio de VP4 diferente del que utiliza el virus silvestre y, consecuentemente, estos virus deben reconocer sitios diferentes sobre la célula, en la primera etapa de la infección. El virus silvestre podría reconocer los dos sitios de manera alternativa, aunque aquel que contiene sialicos sería el reconocido de forma predominante. De acuerdo a los datos disponibles, en el artículo anexo se ha planteado la existencia de dos dominios independientes en VP4: uno que se utiliza durante la interacción con ácidos siálicos y, el otro, que utiliza el virus para establecer una interacción mas estrecha con la célula y que resulta en la penetración del virus.

Las variantes nar y gpr parecen seguir la misma ruta que el virus silvestre después de la adsorción a la célula ya que todos estos virus fueron neutralizados por Mabs anti-VP5 y anti-VP7, en la misma medida. Por reportes previos se sabe que estos Mabs neutralizan al virus en algún paso posterior a la adsorción (46).

Durante las primeras interacciones de un virus con su célula huésped, éste sufre una serie de cambios conformacionales que resultan en la entrada del mismo y la posterior replicación de su genoma. Estos cambios estructurales resultan después de un paso de "activación" provocado por la interacción del virus con su receptor (ej.

poliovirus, Rhinovirus y Sindbis) (5, 45), de la exposición a un pH determinado (ej. virus de influenza y Semliki Forest) (24, 25), etc. Los cambios así producidos son específicos para cada virus, sin embargo, existen varios casos en los que el cambio más notable es la exposición de regiones hidrofóbicas o anfipáticas, que le permiten al virus interactuar con la membrana celular y posteriormente penetrar. Algunos otros virus más complejos como el virus Herpes Simple y Citomegalovirus, penetran a la célula por fusión de membranas después de una serie de interacciones entre distintas glicoproteínas virales con componentes celulares (49).

La penetración de rotavirus, como se mencionó en el artículo anexo, podría ser el resultado de varios pasos que involucren la interacción de VP4, a través de diferentes dominios (ej. un dominio que le permite al virus adsorberse a residuos de siálicos, otro responsable directamente de la penetración, quizá utilizando diferentes moléculas celulares). La función de la otra proteína de capa externa (VP7) parece ser más oscura, en cuanto a que no se tienen indicios de su función durante los primeros pasos de la infección, a pesar de ser la proteína más abundante de la capa externa. Las variantes nar y gpr pueden ser de utilidad en el estudio y caracterización de las moléculas celulares que intervienen en los procesos de adsorción y penetración del virus.

Hasta ahora, no se ha demostrado que los rotavirus modifiquen su estructura después de la adsorción a su célula huésped, como en los casos de otros virus previamente mencionados. Sin embargo, después del tratamiento con tripsina, las partículas de rotavirus se hacen más hidrofóbicas adquiriendo la capacidad de unirse a liposomas. La interacción virus-liposoma es independiente de la presencia de ácidos siálicos en el liposoma (38).

No se sabe si el tratamiento con tripsina, que hace al virus silvestre más hidrofóbico, favorece que la partícula viral interactúe con la molécula celular responsable de la penetración. Si éste fuera el caso, se podría pensar que los cambios que existen en las variantes nar y gpr, con respecto al virus silvestre, favorecen su interacción directa con la molécula responsable de la penetración, sin la necesidad de interactuar previamente con ácidos siálicos. La susceptibilidad a tripsina, y por lo tanto la capacidad de hacerse más hidrofóbicas podrían estar modificadas en las variantes. Esta posibilidad, aunque no ha sido explorada, requiere un estudio posterior más profundo

De manera adicional a la hipótesis planteada previamente, en la que se propone la interacción del virus a través de dos dominios diferentes de VP4, existen otras dos

explicaciones alternativas con respecto al comportamiento de las variantes nar y gpr en células tratadas con neuraminidasa.

1. Los virus nar y gpr pueden reconocer otras formas anoméricas del ácido siálico, que no son eliminadas con eficiencia por las neuraminidasas utilizadas, como sitios iniciales de interacción con la célula huésped; un caso similar ha sido descrito con el virus de influenza (59). De ser así, los cambios en las variantes tendrían que ser en el mismo dominio de VP4, que interacciona con siálicos en el virus silvestre, de manera que la unión de los Mabs anti-VP8 y la hemaglutinación de las variantes deberían estar modificados; por lo tanto, éste no parece ser el caso.

2. Las variantes podrían reconocer moléculas totalmente diferentes a ácidos siálicos como sitios de interacción inicial con la célula. No es claro si las variantes nar y gpr continúan reconociendo a los ácidos siálicos como primer sitio de contacto con células normales o, si las mutaciones en VP4 han afectado esta unión, de manera que ahora reconocen una molécula de diferente naturaleza. Se ha reportado que la infectividad con algunas cepas de rotavirus se afecta parcialmente por el tratamiento con β -galactosidasa (53); además, se ha reportado que una cepa de rotavirus animal puede unirse a residuos de NAcGal y Gal por ensayos *in vitro* (50); este tipo de moléculas podrían participar en las primeras interacciones del virus con la célula, en ausencia de ácidos siálicos.

En ambos casos, aunque se plantean moléculas de diferente naturaleza como sitios de interacción inicial del virus con la célula, la molécula responsable de la penetración sería la misma.

Cualesquiera que sean las moléculas que reconocen los rotavirus en la primera fase de la infección, es claro que los residuos de ácido siálico no son indispensables, ya que se han obtenido las variantes nar y gpr, que no los requieren. La proteína VP4 está relacionada con la expresión del fenotipo de resistencia al tratamiento de las células con neuraminidasa y, por lo tanto, parece intervenir en la interacción inicial del virus con la célula, en presencia o ausencia de esos residuos.

Aunque no se pudo aislar un virus rearreglante monogénico que contuviera el gene 4 de las variantes (gpr8 o gpr34) en la coinfección con SA11, parece ser claro que el fenotipo mutante segrega con el gene que codifica para VP4. De acuerdo a la Tabla 1, incluida en el artículo, se puede ver que en todos los virus rearreglantes que contienen el gene 4 de la variante y que son resistentes al tratamiento de las células con neuraminidasa, también está presente el gene 10 del mismo virus. De acuerdo a esta misma tabla, se puede apreciar que el gene 10 por sí mismo no determina el fenotipo

mutante. Dado que este gene codifica para una proteína "no estructural" (NS28) y los ensayos de infectividad realizados evalúan la capacidad de infección de partículas virales que carecen de este tipo de proteínas, es poco probable que NS28 influya en el fenotipo mutante. Sin embargo, también existe la posibilidad de que esta proteína participe de manera indirecta en el fenotipo mutante como resultado de su función durante el ensamblaje de la partícula e incorporación de VP4 en el virión (1, 36); aunque poco probable, es necesario descartar esta posibilidad.

La interacción del virus polio con su receptor, cuando éste se encuentra sobre la superficie celular, provoca cambios que promueven el desnudamiento y la penetración del virus (45). De esta manera, se quiso determinar si la interacción de los rotavirus RRV y DS1XRRV, con los ácidos siálicos de la gphA en forma soluble podrían promover cambios estructurales en el virión, que, a su vez, provocaran la penetración de éstos a células tratadas con neuraminidasas. Estos virus, preincubados con gphA, presentan menor infectividad, tanto en células normales como en células carentes de ácidos siálico, por lo que, aparentemente, la interacción del virus animal con estos residuos no son suficientes para que se lleven a cabo los cambios necesarios durante la penetración del virus a la célula. Si los residuos de ácido siálico provocaran cambios estructurales en estos virus que promovieran su penetración, la infectividad del virus preincubado con gphA sería la misma, lo que no ocurre; a menos que los cambios tuvieran que realizarse en el mismo sitio en donde se producen, es decir, sobre la membrana celular.

Las mutaciones en la proteína VP4 de las variantes parecen ser en un sitio que no está involucrado directamente con la unión a siálicos; por el contrario, las mutaciones parecen localizarse en regiones de VP4 que intervienen en pasos posteriores a la adsorción. De acuerdo al análisis con Mabs y los ensayos de hemaglutinación e inhibición de hemaglutinación, los cambios parecen estar localizados en el polipeptido VP5, que es el producto carboxilo terminal que resulta del corte de VP4 con tripsina. Aunque menos probable, los cambios también podrían ser en VP8, pero en un sitio independiente del sitio de unión a gphA y a los Mabs.

Se han aislado mutantes del virus polio que son resistentes a la neutralización con su receptor en forma soluble (22, 45). Estas mutantes denominadas "srr", se unen con menor eficiencia que el virus silvestre a su receptor celular; sin embargo, la infección de ambos es similar, es decir, rinden la misma cantidad de partículas infecciosas en el mismo tiempo de infección. Se ha sugerido que estos virus, (poliovirus silvestre y

mutantes srr), presentan diferencias que se manifiestan en distintos pasos de la infección (adsorción, penetración y/o desnudamiento). Al igual que las mutantes srr de poliovirus no requieren unirse a su receptor sobre la célula, las mutantes nar y gpr no requieren la unión al ácido siálico para la infección, lo que implica que, o reconocen una molécula alternativa como primer sitio de contacto con la célula, o interactúan directamente con una molécula adicional e independiente, que interviene en pasos posteriores a la adsorción.

Las variantes nar y gpr tienen semejanzas con cepas de rotavirus animales y humanos. Por un lado, estas variantes mantienen su capacidad para aglutinar eritrocitos y unirse a siálicos, como las cepas animales; por otro lado, la infectividad de las variantes no se afecta por el tratamiento de las células con neuraminidasa ni por la presencia de gphA; además, anticuerpos que reconocen epítopes de VP8 no neutralizan a las variantes, como parece ocurrir entre las cepas humanas. La adsorción entre ambos grupos de rotavirus, humanos y animales, es claramente diferente en cuanto a sus requerimientos por siálicos, sin embargo, no se sabe si en algún momento de la infección, estos virus siguen una vía común para entrar a la célula. Un hecho notable es que la infectividad de los rotavirus humanos incrementa, hasta más de dos veces, en el caso de las células CV1 y LLCMK2, por el tratamiento con neuraminidasa. Este comportamiento de las cepas humanas sugiere que los residuos de ácido siálico impiden la interacción del virus con un sitio que promueve la infección a la célula.

Al igual que las cepas humanas, la infectividad de la cepa de simio RRV fue resistente al tratamiento de las células LLCMK2 tratadas con neuraminidasa. No se sabe si el comportamiento de RRV en este tipo celular está directamente relacionado con aquel que se presenta entre los rotavirus humanos o con las variantes nar y gpr en células MA104. Se requieren posteriores estudios, incluyendo experimentos de competencia entre diferentes rotavirus (nar y gpr, rotavirus humanos y animales, en diferentes líneas celulares), para explorar lo anterior y poder establecer relaciones entre todos los rotavirus.

El estudio de las variantes nar y gpr de rotavirus descritas en el presente trabajo ha sido de utilidad para conocer algunos aspectos relacionados con las primeras interacciones del virus con su célula huésped. Sin embargo, han surgido preguntas interesantes con respecto al comportamiento de las mutantes nar y gpr, que, de obtener

respuesta, contribuirán a conocer más acerca del mecanismo de infección de los rotavirus. Algunas de estas preguntas son:

1. ¿Cuales son los aminoácidos responsables del fenotipo siálico-independiente en VP4?
2. Si las variantes nar y gpr son capaces de unirse a los ácidos siálicos de la gphA, ¿Seguirán estas variantes la misma ruta que el virus silvestre durante la infección en células normales? ¿Cuál es la naturaleza de la molécula a la que se adsorben? ¿Es esta molécula celular responsable de la penetración del virus? ¿Podrían los rotavirus reconocer más de un sitio en una célula como sitio de interacción inicial durante una infección?.
3. Los ácidos siálicos parecen ser importantes durante la infección por rotavirus *in vivo*. ¿Será diferente la virulencia de las mutantes nar y gpr a la del virus silvestre?.
4. A pesar de reaccionar con Mabs anti-VP8, las mutantes nar y gpr no son neutralizados por estos Mabs. Si se obtuvieran Mabs neutralizantes contra las variantes nar y gpr, ¿Como serían estos Mabs con respecto al virus silvestre? ¿Serán similares a los inducidos contra el virus silvestre, contra VP8, o serán contra VP5 preferencialmente, como los inducidos por los rotavirus humanos?
5. ¿Siguen una vía común de entrada los rotavirus humanos y animales?, de ser así, ¿Que papel juegan los ácidos siálicos en la infección por rotavirus humanos?
6. ¿Favorecerá algún gene del rotavirus DS1XRRV la expresión del fenotipo nar o gpr?, específicamente, ¿Influirá la proteína VP7 tipo G3 (RRV) en la expresión del fenotipo gpr o nar y en la selección de las variantes mencionadas a partir de DS1XRRV?.

Las respuestas a estas preguntas serán de gran ayuda para entender un poco mejor algunos aspectos de la biología de los rotavirus, principalmente durante los procesos de adsorción y penetración del virus a la célula huésped. Por otra parte, estas variantes serán una herramienta útil para conocer y caracterizar cual(es) moléculas celulares funcionan como receptores para rotavirus.

APENDICE. RECEPTORES VIRALES Y DOMINIOS DE UNION DEL RECEPTOR Y LAS PROTEINAS VIRALES DE ADSORCION.

VIRUS	RECEPTOR	DOMINIO DE UNION DEL RECEPTOR	PROTEINA VIRAL DE ADSORCION
VIRUS DE DNA:			
Poliovirus	Sialiloligosacáridos	NeuAc 2,3 Gal 1,3 GalNAc	
Adenovirus humano	MHC HLA clase I		Residuos 1-141 de E3gp
Citomegalovirus humano	2-microglobulina MHC HLA Clase I		Residuos 204-297 de H301
V. Epstein-Barr	CR2, receptor de C3d de linfocitos B		Residuos 21-29 y 372-378 de gp350
V. Herpes Simple	Heparan sulfato		gpC y gpB
V. Vaccinia	Receptor para el factor de crecimiento epidérmico		Residuos 71-80 de VGF
V. Hepatitis B	Receptor para albumina sérica polimerizada, para IgA polimérica en hepatocito. Sialoglicoproteína.		Porción preS de env, residuos 21-47.
VIRUS DE RNA:			
Poliovirus	Proteína miembro de la familia de las IgG		Residuos 95-105 de VP1
Rhinovirus humano	ICAM-1		Cañón en la superficie del virión formado por residuos de VP1 (aa. 103, 155, 220, 223) y VP3.
V. encefalomiocarditis	Sialoglicoproteínas		
V. Mengo			Residuos de VP1 y VP3, sobre la superficie del virión
V. fiebre aftosa	Integrinas (proteínas de adhesión)		Residuos 145-147 y 203-213 de VP1
Reovirus	sialoglicoproteínas		Carboxilo terminal de la hemaglutinina.
V. Semliki forest	MHC H-2 y HLA clase I		
V. Influenza	Sialiloligosacáridos	Influenza A: NeuAc 2,6Gal 1,4GlcNAc NeuAc 2,3Gal 1,3GalNAc NeuAc 2,3Gal 1,4GlcNAc	Diferentes residuos de la superficie de la hemaglutinina viral (aa. 98, 134-138, 153, 155, 183, 186, 190, 194, 195, 226 y 228)

V. Sendai	Siáliloligosacaridos	Influenza C: 9-O-AcNeuAc NeuAc 2,3Gal 1,3GalNAc NeuAc 2,8NeuAc 2,3Gal 1,3GalNAc	
V. Newcastle	Siáliloligosacaridos	NeuAc 2,3Gal 1,3GalNAc	
V. estomatitis vesicular	Fosfatidilserina Fosfatidilinositol, gangliosido GM3		
V. Rabia	Receptor de acetilcolina y gangliosidos sializados	Residuos 173-204 de la subunidad alfa de acetilcolina	Residuos 151-238 de la proteina G
HTLV-1	MHC IIIA clase I, receptor de interleucina-2		Residuos 246-253 de la gp env
V. inmunodeficiencia humana	Molecula CD4 de linfocitos T	Residuos 41-55 de CD4	Trp-432 de gp120

Adaptado de Lentz, T. J. Gen Virol. 71: 751-766 (1990).

REFERENCIAS.

1. Au, K. S., W. K. Chan, J. W. Burns, and M. K. Estes. 1989. Receptor activity of rotavirus nonstructural glycoprotein NS28. *J Virol.* 63:4553-62.
2. Bass, D., M. Baylor, and H. Greenberg, Cellular Tropism of Rotavirus in Tissue Culture is Determined by Viral Penetration of the Cell Plasma Membrane., I. K. Symposias, Eds., *Cell Biology of Virus Entry, Replication and Pathogenesis.* (Wiley-Liss, Taos, New Mexico, 1992), vol. Supplement 16C, 1992, pp. 114.
3. Bass, D. M., E. R. Mackow, and H. B. Greenberg. 1991. Identification and partial characterization of a rhesus rotavirus binding glycoprotein on murine enterocytes. *Virology.* 183:602-10.
4. Bishop, R. F., G. P. Davidson, I. H. Holmes, and B. J. Ruck. 1973. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with viral gastroenteritis. *Lancet.* 1281-1283.
5. Brown, D. T. and J. Edwards. 1992. Structural changes in alphaviruses accompanying the process of membrane penetration. *Seminars in Virology.* 3:519-527.
6. Chen, D., J. W. Burns, M. K. Estes, and R. F. Ramig. 1989. Phenotypes of rotavirus reassortants depend upon the recipient genetic background. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86:3743-7.
7. Chen, D., M. K. Estes, and R. F. Ramig. 1992. Specific interactions between rotavirus outer capsid proteins VP4 and VP7 determine expression of a cross-reactive, neutralizing VP4-specific epitope. *J. Virol.* 66:432-439.
8. de, Z. I. and R. G. Feachem. 1985. Interventions for the control of diarrhoeal diseases among young children: rotavirus and cholera immunization. *Bull World Health Organ.* 63:569-83.

9. Espejo, R. T., S. Lopez, and C. Arias. 1981. Structural polypeptides of simian rotavirus SA11 and the effect of trypsin. *J Virol.* 37:156-60.
10. Estes, M. K. and J. Cohen. 1989. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol Rev.* 53:410-49.
11. Estes, M. K., D. Y. Graham, and B. B. Mason. 1981. Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: molecular mechanisms. *J Virol.* 39:879-88.
12. Fiore, L., H. B. Greenberg, and E. R. Mackow. 1991. The VP8 fragment of VP4 is the rhesus rotavirus hemagglutinin. *Virology.* 181:553-63.
13. Fukudome, K., O. Yoshie, and T. Konno. 1989. Comparison of human, simian, and bovine rotaviruses for requirement of sialic acid in hemagglutination and cell absorption. *Virology.* 172:196-205.
14. Fukuhara, N., O. Yoshie, S. Kitaoka, and T. Konno. 1988. Role of VP3 in human rotavirus internalization after target cell attachment via VP7. *J Virol.* 62:2209-18.
15. Gallegos, C. O. and J. T. Patton. 1989. Characterization of rotavirus replication intermediates: a model for the assembly of single-shelled particles. *Virology.* 172:616-27.
16. Gorziglia, M., K. Green, K. Nishikawa, K. Taniguchi, R. Jones, A. Z. Kapikian, and R. M. Chanock. 1988. Sequence of the fourth gene of human rotaviruses recovered from asymptomatic or symptomatic infections. *J Virol.* 62:2978-84.
17. Green, K. Y., K. Taniguchi, E. R. Mackow, and A. Z. Kapikian. 1990. Homotypic and heterotypic epitope-specific antibody responses in adult and infant rotavirus vaccinees: implications for vaccine development. *J Infect Dis.* 161:667-79.
18. Holmes, K. 1990. Coronaviruses. *In* B. Fields (eds.), *Coronaviruses*. Raven Press Ltd., New York
19. Kalica, A. R., J. Flores, and H. B. Greenberg. 1983. Identification of the rotaviral gene that codes for hemagglutination and protease-enhanced plaque formation. *Virology.* 125:194-205.

20. Kaljot, K. T., R. D. Shaw, D. H. Rubin, and H. B. Greenberg. 1988. Infectious rotavirus enters cells by direct cell membrane penetration, not by endocytosis. *J Virol.* 62:1136-44.
21. Kapikian, A. Z. and R. M. Chanock. 1985. Rotaviruses. 863-906. *In* B. N. Fields, D. N. Knipe, J. L. Melnick, R. M. Chanock, B. Roizman, and R. E. Shope (eds.), *Rotaviruses*. Raven Press, New York
22. Kaplan, G., D. Peters, and V. R. Racaniello. 1990. Poliovirus mutants resistant to neutralization with soluble cell receptors. *Science.* 250:1596-1599.
23. Keljo, D. J. and A. K. Smith. 1988. Characterization of binding of simian rotavirus SA-11 to cultured epithelial cells. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 7:249-56.
24. Kielian, M. 1993. Membrane fusion in alphaviruses. 385-412. *In* J. Bentz (eds.), *Membrane fusion in alphaviruses*. CRC Press, Boca Raton, FL
25. Kielian, M. and S. Jungerwirth. 1990. Mechanisms of enveloped virus entry into cells. *Mol. Biol. Med.* 7:17-31.
26. Lentz, T. L. 1990. The recognition event between virus and host cell receptor: a target for antiviral agents. *J. Gen. Virol.* 71:751-766.
27. Levy-Mintz, P. and M. Kielian. 1991. Mutagenesis of the putative fusion domain of the Semliki Forest virus spike protein. *J. Virol.* 65:4292-4300.
28. Liu, M., N. M. Mattion, and M. K. Estes. 1992. Rotavirus VP3 expressed in insect cells possesses guanylyltransferase activity. *Virology.* 188:77-84.
29. Lizano, M., S. Lopez, and C. F. Arias. 1991. The amino-terminal half of rotavirus SA114fM VP4 protein contains a hemagglutination domain and primes for neutralizing antibodies to the virus. *J Virol.* 65:1383-91.

30. Lopez, S., C. F. Arias, J. R. Bell, J. H. Strauss, and R. T. Espejo. 1985. Primary structure of the cleavage site associated with trypsin enhancement of rotavirus SA11 infectivity. *Virology*. 144:11-9.
31. Lopez, S., I. Lopez, P. Romero, E. Mendez, X. Soberon, and C. F. Arias. 1991. Rotavirus YM gene 4: analysis of its deduced amino acid sequence and prediction of the secondary structure of the VP4 protein. *J Virol*. 65:3738-45.
32. Mackow, E. R., J. W. Barnett, H. Chan, and H. B. Greenberg. 1989. The rhesus rotavirus outer capsid protein VP4 functions as a hemagglutinin and is antigenically conserved when expressed by a baculovirus recombinant. *J Virol*. 63:1661-8.
33. Mackow, E. R., R. D. Shaw, S. M. Matsui, P. T. Vo, M. N. Dang, and H. B. Greenberg. 1988. The rhesus rotavirus gene encoding protein VP3: location of amino acids involved in homologous and heterologous rotavirus neutralization and identification of a putative fusion region. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 85:645-9.
34. Mackow, E. R., R. D. Shaw, S. M. Matsui, P. T. Vo, M. N. Dang, and H. B. Greenberg. 1988. The rhesus rotavirus gene encoding protein VP3: location of amino acids involved in homologous and heterologous rotavirus neutralization and identification of a putative fusion region. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 85:645-9.
35. Matsui, S. M., E. R. Mackow, and H. B. Greenberg. 1989. Molecular determinant of rotavirus neutralization and protection. *Adv Virus Res*.
36. Meyer, J. C., C. C. Bergmann, and A. R. Bellamy. 1989. Interaction of rotavirus cores with the nonstructural glycoprotein NS28. *Virology*. 171:98-107.
37. Mitchell, D. B. and G. Both. 1990. Completion of the genomic sequence of the simian rotavirus SA11: nucleotide sequence of segments 1, 2, and 3. *Virology*. 177:324-331.
38. Nandi, P., A. Charpillienne, and J. Cohen. 1992. Interaction of Rotavirus Particles with Liposomes. *J. Virol*. 66:3363-3367.

39. Offit, P. A., G. Blavat, H. B. Greenberg, and H. F. Clark. 1986. Molecular basis of rotavirus virulence: role of gene segment 4. *J Virol.* 57:46-9.
40. Offit, P. A., H. F. Clark, G. Blavat, and H. B. Greenberg. 1986. Reassortant rotaviruses containing structural proteins vp3 and vp7 from different parents induce antibodies protective against each parental serotype. *J Virol.* 60:491-6.
41. Padilla-Noriega, L., C. F. Arias, S. López, F. Puerto, D. R. Snodgrass, K. Taniguchi, and H. Greenberg. 1990. Diversity of rotavirus serotypes in Mexican infants with gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol.* 28:1114-1119.
42. Prasad, B. V., J. W. Burns, E. Marietta, M. K. Estes, and W. Chiu. 1990. Localization of VP4 neutralization sites in rotavirus by three-dimensional cryo-electron microscopy. *Nature.* 343:476-9.
43. Prasad, B. V., G. J. Wang, J. P. Clerx, and W. Chiu. 1988. Three-dimensional structure of rotavirus. *J Mol Biol.* 199:269-75.
44. Prasad, B. V. V., R. Rothnagel, A. Shaw, Q. Y. Zeng, D. Chen, J. Cohen, M. K. Estes, R. F. Ramig, and W. Chiu, Three-Dimensional Structural Studies on Rotavirus, M. K. E. a. L. Mindichs, Eds., Fourth International Symposium on Double-Stranded RNA Viruses Scottsdale, Arizona, 1992), pp. 16.
45. Racaniello, V. R. 1992. Interaction of poliovirus with its cell receptor. *Seminars in Virology.* 3:473-481.
46. Ruggeri, F. M. and H. B. Greenberg. 1991. Antibodies to the trypsin cleavage peptide VP8 neutralize rotavirus by inhibiting binding of virions to target cells in culture. *J Virol.* 65:2211-9.
47. Sabara, M., J. E. Gilchrist, G. R. Hudson, and L. A. Babiuk. 1985. Preliminary characterization of an epitope involved in neutralization and cell attachment that is located on the major bovine rotavirus glycoprotein. *J Virol.* 53:58-66.
48. Sandino, A. M., M. Jashes, G. Faundez, and E. Spencer. 1986. Role of the inner protein capsid on in vitro human rotavirus transcription. *J Virol.* 60:797-802.

49. Spear, P. G. 1993. Membrane fusion induced by Herpes Simplex Virus. 201-232. *In* J. Bentz (eds.), Membrane fusion induced by Herpes Simplex Virus. CRC Press, Boca Raton, FL
50. Srnka, C. A., M. Tiemeyer, J. H. Gilbert, M. Moreland, H. Schweingruber, B. W. De Lappe, P. G. James, T. Gant, R. E. Willoughby, R. H. Yolken, M. A. Nashed, S. A. Abbas, and R. A. Laine. 1992. Cell Surface Ligands for Rotavirus: Mouse Intestinal Glycolipids and Synthetic Carbohydrate Analogs. *Virology*. 190:794-805.
51. Stirzaker, S. C. and G. W. Both. 1989. The signal peptide of the rotavirus glycoprotein VP7 is essential for its retention in the ER as an integral membrane protein. *Cell*. 56:741-7.
52. Stirzaker, S. C., P. L. Whitfeld, D. L. Christie, A. R. Bellamy, and G. W. Both. 1987. Processing of rotavirus glycoprotein VP7: implications for the retention of the protein in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*.
53. Superti, F. and G. Donelli. 1991. Gangliosides as binding sites in SA-11 rotavirus infection of LLC-MK2 cells. *J Gen Virol*.
54. Svensson, L. 1992. Group C rotaviruse requires sialic acid for erythrocyte and cell receptor binding. *J. Virol*. 66:5582-5585.
55. Taniguchi, K., W. L. Maloy, K. Nishikawa, K. Y. Green, Y. Hoshino, S. Urasawa, A. Z. Kapikian, R. M. Chanock, and M. Gorziglia. 1988. Identification of cross-reactive and serotype 2-specific neutralization epitopes on VP3 of human rotavirus. *J Virol*. 62:2421-6.
56. Valenzuela, S., J. Pizarro, A. M. Sandini, M. Vasquez, J. Fernandez, O. Hernandez, J. Patton, and E. Spencer. 1991. Photoaffinity labeling of rotavirus VP1 with 8-azido-ATP: Identification of the viral RNA polymerase. *J. Virol*. 65:3964-3967.
57. Verduin, B. J. M. 1992. Early interactions between viruses and plants. *Seminars in Virology*. 3:423-431.

58. Willoughby, R. E. and R. H. Yolken. 1990. SA11 rotavirus is specifically inhibited by an acetylated sialic acid. *J Infect Dis.* 161:116-9.

59. Yewdell, J., A. J. Caton, and W. Gerhard. 1986. Selection of influenza A virus adsorptive mutants by growth in the presence of a mixture of monoclonal antihemagglutinin antibodies. *J. Virol.* 57:623-628.

60. Yolken, R. H., R. Willoughby, S. B. Wee, R. Miskuff, and S. Vonderfecht. 1987. Sialic acid glycoproteins inhibit in vitro and in vivo replication of rotaviruses. *J Clin Invest.* 79:148-54.