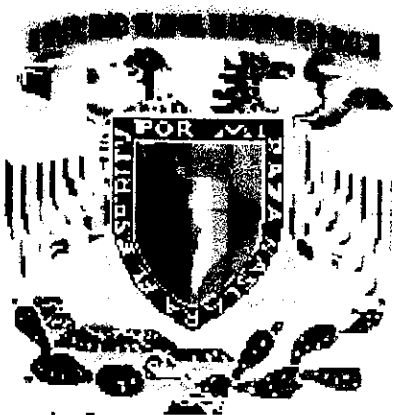


11281



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y
DE POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS
Y HUMANIDADES

11

**IDENTIFICACION Y
CARACTERIZACION DE
RECEPTORES CELULARES PARA
ROTAVIRUS**

T E S I S

**DE DOCTORADO EN
BIOQUIMICA**

CARLOS ARTURO GUERRERO FONSECA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

CUERNAVACA, MOR.

AGOSTO DEL 2000

28/8/00





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se realizó en el Departamento de Genética y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM, bajo la asesoría del Dr. Carlos F. Arias O.

El comité Tutorial estuvo conformado por:

Dr. Carlos F. Arias O.

Dra. Patricia Joseph

Dr. Alejandro Alagón

DEDICATORIAS

A mis familiares, amigos y relacionados que en alguna forma han contribuido a cumplir con mi sueño de hacer investigación. En especial a mi papá y a Liz Patricia quien fue determinante para tomar la decisión de hacer el Doctorado.

A los padres del materialismo dialéctico y a quienes han contribuido a su desarrollo y me enseñaron que "El mundo no se compone de un conjunto de objetos terminados y acabados, sino que representa un conjunto de procesos, en el que los objetos que parecen inmutables, al igual que sus imágenes mentales en nuestra cabeza, los conceptos, están en continuo cambio, ya surgen, ya desaparecen. Es la materia la que gobierna al espíritu, no al contrario; y nada está estático sino que todo circula y se modifica permanentemente. Lo que ora es efecto, luego actúa de causa y viceversa. Lo que se desempeña como general en el contexto, en otro lo hace de particular...En la producción social de su vida los hombres entran en determinadas relaciones necesarias e independientes de su voluntad, relaciones de producción que corresponden a una determinada etapa del desarrollo de sus fuerzas productivas materiales. El conjunto de estas relaciones de producción constituye la estructura económica de la sociedad, la base real sobre la que se erige una superestructura jurídica y política y a la que corresponden determinadas formas de conciencia social. El modo de producción de la vida material condiciona el proceso de la vida social, política y espiritual en general. No es la conciencia del hombre la que determina su ser, sino, por el contrario, su ser social el que determina su conciencia".

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de Colombia: por concederme la licencia remunerada y especial de estudios para llevar a cabo mis estudios de Doctorado. En especial al Dr. Orlando Acosta, por el apoyo que me ha brindado para culminar este proyecto.

Al Dr. Carlos Arias Ortiz: por brindarme su enseñanza y orientación a lo largo del trabajo.

Al comité tutorial: por su orientación y crítica

Dr. Carlos Arias Ortiz

Dra. Patricia Joseph

Dr. Alejandro Alagón

Al honorable jurado por su asesoría, revisión y crítica de este trabajo

Dr. Federico Sanchez

Dr. Carlos Arias Ortiz

Dra. Alejandra Covarrubias

Dr. Jean Louis Charli

Dr. Fernando Esquivel

Dr. Celso Ramos.

Dr. José Luis Puente

A Todos los que contribuyeron para desarrollar la presente investigación:

Selene Zarate: por las pruebas de unión

Pavel Isa: por las pruebas de citometría de flujo

Ernesto Mendez: por el manejo de las células transfectadas y la transfección de genes

Tomás López: por las pruebas de choque térmico

Rafaela Espinosa: por las pruebas de inmunofluorescencia

Elizabeth Mata: por el cuidado y manejo de los conejos para inoculación

Xóchitl Alvarado. por asesorar en el uso del microscopio confocal

Liz Patricia Moreno: por asesorar en el diseño técnico de imágenes.

A todos los integrantes del laboratorio del grupo del Dr Carlos Arias/Susana López: por su amistad, su colaboración y crítica

AGRADECIMIENTOS

A las entidades que me apoyaron económicamente durante la realización de mis estudios de Doctorado:

Universidad Nacional de Colombia, por concederme la licencia de estudios remunerada durante tres años.

Al Gobierno de México, por otorgarme una beca durante dos años, a través de la Secretaría de Relaciones Exteriores. La beca fue otorgada por su programa "CUAUHTEMOC II" SRE/CONACYT/OEA.

Al programa Howard Hughes a través del Dr Carlos Arias por la beca que me otorgó durante el Doctorado.

Su apoyo económico fue la base de mi manutención, de gran estímulo para mi desarrollo profesional y de gran ayuda para la conclusión de mis estudios.

INDICE

Resumen	1
Abstract	3
Introducción	5
Generalidades	5
Características generales	5
Ciclo de replicación	6
Interacción virus célula: adsorción y penetración	7
Adsorción	7
Penetración	9
Moléculas celulares implicadas en el proceso de entrada de los rotavirus	10
Integrinas	11
Hsc70	14
Planteamiento del problema	17
Hipótesis	19
Objetivos	19
Resultados	20
"Biochemical characterization of rotavirus receptors in MA104 cells"	22
"Integrin $\alpha v \beta 3$ mediates rotavirus cell entry"	61
Resultados adicionales	84
Materiales y métodos adicionales	85
Materiales y metodos para determinar que la proteína hsc70 puede ser uno de los receptores para rotavirus	85
Resultados Adicionales	91
La proteína hsc70 puede ser uno de receptores para rotavirus	91
Discusión	108
Conclusiones	118
Perspectivas	119
Bibliografía	120
Anexo	127
"Early events of rotavirus infection: the search for the receptor(s)"	129

RESUMEN

En este trabajo estudiamos las interacciones iniciales rotavirus-célula hospedera, que conducen a una infección productiva, específicamente las relacionadas con la unión a proteínas celulares de superficie que los rotavirus utilizan como receptores para infectar. Como parte de la caracterización de la naturaleza bioquímica de los receptores celulares de los rotavirus, se demostró que el tratamiento de las células MA104 derivada de riñón de mono, con inhibidores metabólicos de la N-glicosilación (tunicamicina) e inhibidores de la síntesis de glicolípidos (PDMP), la infectividad de los rotavirus RRV, nar3 y Wa parcialmente se bloqueó mientras que no hubo efecto cuando las células se trataron con inhibidores de la O-glicosilación. Igualmente se demostró que la extracción del colesterol de la membrana citoplasmática con metil- β -ciclodextrina, se redujo la infectividad de los tres rotavirus en más de 90%, sin afectar la unión de los virus a la célula.

El tratamiento de las células MA104 con el detergente no iónico, β -octil glucósido (OG), en condiciones no citolíticas, convirtió las células en refractarias a la unión y a la infección probablemente por la extracción de los receptores para rotavirus. Este fenómeno se correlacionó con la inhibición de más del 95% de la infectividad, cuando se pre-incubó el extracto OG con los rotavirus. Por electroforesis preparativa se aislaron del extracto OG cinco bandas de proteínas que inhibieron la infección y el análisis de la secuencia de aminoácidos de dos de esas bandas (72 y 110 kDa), revelaron la presencia, entre otras, de la proteínas "heat shock cognate" (hsc70) y de la subunidad β 3 integrina, respectivamente.

La relevancia de la integrina β 3 para la infección de los rotavirus se estableció por la observación de que anticuerpos (Ac) dirigidos contra esta proteína redujeron en 50% la infectividad de los virus RRV, nar3 y Wa. En correlación con este hallazgo, la infectividad de los rotavirus se redujo en aproximadamente 70% cuando las células se pre-incubaron con Vitronectina, un ligando de la integrina β 3. Dado que se había sugerido que las integrinas α 2 β 1, α 4 β 1 y α x β 2 estaban implicadas en el proceso de entrada de los rotavirus a la célula, utilizamos una mezcla de Acs dirigidos contra esas integrinas y contra α v β 3. Los resultados mostraron claramente un efecto aditivo en el bloqueo de la infectividad cuando se mezclaron los Acs contra α 2 β 1 y α v β 3, sugiriendo que estas dos integrinas pueden estar involucradas en diferentes etapas de la infección.

La expresión de la integrina β 3 en las células CHO transfectadas, normalmente poco susceptibles a la infección, aumentaron la infectividad por rotavirus. Las células CHO transfectadas establemente con el gene de la integrina β 3, que sobreexpresan la integrina α IIb β 3 y α v β 3, fueron

tres a cuatro veces más susceptibles a la infección por rotavirus que la línea parental CHO. Este incremento se revirtió cuando se incubaron las células con Acs contra $\beta 3$ o con vitronectina. Además, se observó que la interacción de $\alpha v \beta 3$ con los rotavirus ocurre en un paso posterior a la unión, probablemente en la penetración, dado que no se bloquea, o se bloquea muy poco la unión de los rotavirus, cuando se incuban las células con la vitronectina, o con los Acs contra las integrinas $\alpha v \beta 3$. También mostramos que la unión de los rotavirus con la integrina $\beta 3$ es independiente de la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD), esto se esperaba por el hecho que ni VP4 ni tampoco VP7 tienen este motivo de unión a integrinas.

Mediante citometría de flujo, inmunofluorescencia y biotinylación de las proteínas de la célula, demostramos que la proteína hsc70 se encuentra en la superficie de las células MA104. Para evaluar el papel de esta proteína durante la entrada de los rotavirus, analizamos la capacidad de los Acs monoclonales contra hsc70 de bloquear la infectividad. Cuando se pre-incubaron las células con los Acs, éstos bloquearon de manera específica los rotavirus RRV, nar3 y Wa en aproximadamente 80%. Estos Acs no impiden la unión de los rotavirus a la célula, sugiriendo que actúan en un paso posterior a la unión. En correlación a esta observación, hubo una inhibición de más del 90% en la infectividad cuando se adicionó la proteína recombinante hsc70 humana a células a las que previamente se habían adherido partículas de rotavirus a 4°C, contra 40-50% de inhibición de la infectividad cuando la proteína se incubó con los rotavirus antes de la infección, indicando que la proteína hsc70 puede interactuar más eficientemente con los virus cuando éstos ya se han unido a la célula. Aunque el papel de la proteína hsc70 no se ha determinado aún, estos datos sugieren que ésta proteína puede estar implicada en la entrada de los rotavirus a la célula MA104.

ABSTRACT

In this work we studied the rotavirus-host cell early interactions that lead to a productive infection, specifically those related to the binding of cells with proteins that rotaviruses used as receptors for infection. As part of the biochemical characterization of the rotavirus cell receptors, we have shown that the infectivity of rotaviruses RRV, nar3, and Wa is partially blocked by metabolic inhibitors of N-glycosylation (tunicamycin) and by glycolipid synthesis (PDMP), yet it is not affected by the inhibition of the cellular O-glycosylation. In addition, we also showed that sequestration of cholesterol from the cell membrane with methyl- β -cyclodextrin reduced the infectivity of the three viruses by more than 90% without affecting their binding to the cell.

In a different approach we showed that treatment of MA104 cells with the non-ionic detergent β -octylglucoside (OG), under non-lytic conditions, renders the cells largely refractory to binding and infection by rotaviruses, most probably due to the extraction of the rotavirus receptor(s). Accordingly, pre-incubation of the viruses with the OG extract inhibited infectivity by more than 95%. Five protein bands with the ability to block rotavirus infectivity were purified by preparative electrophoresis from these extracts. Amino acid sequence analysis of bands of 72 and 110 kDa revealed the presence, of the heat shock cognate protein (hsc70) and of the β 3 integrin subunit, among other proteins, respectively.

The relevance of β 3 integrin for rotavirus infection was established by the fact that antibodies to this integrin subunit reduced the infectivity of RRV, nar3 and Wa rotaviruses by 50%. In accordance with this finding, when vitronectin, a β 3 integrin ligand, was pre-incubated with the cell, it specifically blocked rotavirus infectivity up to 70 %.

Since it has been suggested that integrins α 2 β 1, α 4 β 1, and α X β 2 may play a role in rotavirus entry, we performed blocking experiments using mixes of antibodies directed to these integrins and to α V β 3. A clear additive blocking effect was found when antibodies to integrins α 2 β 1 and α V β 3 were mixed, suggesting that these two integrins might be involved in different stages of rotavirus infection.

The expression of β 3 integrin into the poorly permissive CHO cells was shown to facilitate the infectivity of rotaviruses. We found that when CHO cells were transfected in stable form with the β 3 integrin gene, overexpressing either α I**b β 3 and α V β 3 integrins, were three to four times more susceptible to rotavirus infection than the parental CHO cell line. This increase in infectivity was shown to be blocked by incubation of the cells with either MAbs to β 3 or vitronectin.**

Furthermore, it was shown that the interaction of rotaviruses with $\alpha V\beta 3$ is at a post-attachment step, probably penetration, since vitronectin and antibodies to $\beta 3$ do not, or only slightly, inhibit rotavirus cell attachment. Also, the interaction of rotaviruses with $\beta 3$ integrin was found to be RGD-independent, as is expected since neither VP4 nor VP7 have this integrin binding motif.

We have shown the presence of hsc70 protein on the surface of MA104 cells; this was demonstrated by flow cytometry and immunofluorescence of non-permeabilized cells.

To evaluate the role of this protein during rotavirus entry, MAbs to hsc70 were tested for their ability to block infectivity. When pre-incubated with the cell, these MAbs specifically blocked the infectivity of rotaviruses RRV, nar3 and Wa by about 80%. Despite this efficient blocking activity, the MAbs to hsc70 did not prevent virus cell attachment, indicating that they interfere with the virus infectivity at a post-binding step. In accordance with this observation, when recombinant human hsc70 protein is added to the viruses after they have become attached adsorbed to the cell at 4°C, the inhibition of virus infectivity is higher than 90% (versus 40-50% inhibition if the protein is incubated with the viruses before infection), indicating that the protein can interact more efficiently with the viruses when they are already bound to cells. These data suggest that hsc70 protein is involved in rotavirus entry to MA104 cells, although its precise role has yet to be determined.

Introducción

Generalidades

Los rotavirus son el principal agente etiológico de diarreas en niños menores de tres años en todo el mundo. Igualmente son causa importante de diarrea infantil severa en las crías de muchas especies de animales, entre las que se encuentran especies de importancia económica para el hombre.

Estos virus ocasionan aproximadamente el 40 % de las diarreas severas en todo el mundo, lo cual repercute en 870 mil muertes anuales por deshidratación de niños menores de cinco años. Estos virus son la causa del 35- 70% de las hospitalizaciones por diarrea severa en países en vías de desarrollo (31, 44, 47).

Los rotavirus infectan las células epiteliales del intestino delgado, en donde se replican y producen citólisis. Aún no está claro que factor(es) desencadena(n) la diarrea, aunque hay varios candidatos como:

1) La destrucción parcial de las vellosidades del intestino lo que disminuye significativamente la retención de fluido, desencadenando la diarrea (14).

2) Durante la infección, los rotavirus promueven la activación de las células nerviosas entéricas, las cuales estimulan a las células epiteliales de las vellosidades a incrementar su secreción de Cl⁻ y agua (56).

3) La activación de las células epiteliales puede estar mediada por la inflamación del intestino o por la proteína viral NSP4, la cual se ha reconocido como una enterotoxina (2).

La ruta de infección de los rotavirus es fecal-oral y son altamente contagiosos. A pesar de los tratamientos del agua para hacerla potable y las medidas higiénicas convencionales, se estima que en los países desarrollados y subdesarrollados la mayoría de los niños entre 3 y 5 años han sido ya infectados al menos una vez por estos virus (31). En la actualidad no existe una vacuna efectiva que proteja eficientemente de la infección por estos agentes. Es por esto que resulta importante el estudio de la biología molecular del virus y los mecanismos inmunológicos del huésped, para poder, eventualmente, desarrollar medidas racionales de protección contra la infección.

Características generales.

Los rotavirus pertenecen a la familia *Reoviridae*, son virus de simetría icosaédrica que carecen de membrana lipídica y se caracterizan por tener tres capas concéntricas de proteína que envuelven un genoma de 11 segmentos de RNA de doble cadena (dsRNA) (21). Al microscopio electrónico se pueden observar tres tipos de partículas: de triple capa, doble capa y nucleocápsides o "cores" (19).

El genoma de los rotavirus codifica para doce proteínas: seis estructurales (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6, VP7) y seis no estructurales (NS1, NS2, NS3, NS4, NS5, NS6). Las proteínas estructurales forman el virión y se distribuyen en la capa externa, la capa intermedia y la pared de la nucleocápside. La cubierta externa está formada por 260 trímeros de la glicoproteína VP7, y por 60 dímeros de la hemaglutinina viral VP4; ésta última se proyecta de la superficie del virus como espigas de 10-12 nm. La capa intermedia está formada por 260 trímeros de VP6, siendo ésta la proteína más abundante en el virión, con aproximadamente, el 51% de la masa viral. La pared de la nucleocápside o "core" está constituida por 60 dímeros de la proteína VP2, que engloban al genoma viral y a pequeñas cantidades de VP1, que es la polimerasa viral y de VP3, una proteína con actividad de guanililtransferasa. Cada uno de los segmentos del genoma de los rotavirus codifica para una proteína, con excepción del segmento 11, que lo hace para dos proteínas.

La glicoproteína VP7 de la capa externa es la segunda proteína estructural más abundante en el virión, tiene un peso molecular aproximado de 35 kDa y es altamente inmunogénica, induciendo la producción de anticuerpos neutralizantes (19). La otra proteína que constituye la capa externa del virión, VP4, es una proteína no glicosilada que también induce anticuerpos neutralizantes y es capaz de inducir inmunidad protectora en ratones. Propiedades como el rango del huésped, la virulencia, el tropismo y la capacidad de los rotavirus de aglutinar eritrocitos (hemaglutinación, HA) (19) han sido asociadas a esta proteína; así mismo, VP4 juega un papel importante en los primeros eventos de replicación de los rotavirus.

La infectividad de los rotavirus se incrementa por tratamiento del virus con tripsina (12, 26, 46) ocasionando un corte específico sobre VP4, lo cual produce dos polipéptidos, VP8 (extremo amino de 28 kDa) y VP5 (extremo carboxilo de 60 kDa) (17, 20). Se ha propuesto que este corte proteolítico es necesario para la penetración del virus a la célula y aunque no se conoce el mecanismo, se ha sugerido que los extremos recién generados podrían jugar un papel importante en la penetración, probablemente por cambios conformacionales en la proteína VP4 (1, 53).

Ciclo de replicación

Los rotavirus se replican en el citoplasma de la célula hospedera. La infección se inicia con la interacción de alguna(s) de la(s) proteína(s) de la capa externa del virión, con moléculas de la membrana celular. Después de la unión con el receptor, los rotavirus penetran la célula y pierden la capa externa, activándose la transcripción del virus. Los RNAs de polaridad positiva que son sintetizados por la RNA polimerasa viral, cumplen dos funciones: como mRNAs para la traducción de las proteínas virales, y como templates para la síntesis de los RNAs negativos formando así el RNA genómico. La selección, el empaquetamiento, y la replicación de los segmentos del genoma, así como parte de la morfogénesis del virión, se llevan a cabo en estructuras electrodensas citoplasmáticas, denominadas viroplasma, que están compuestos, entre otras cosas, de RNA y de

proteínas virales. Una vez formadas las partículas de doble capa (DLPs), éstas abandonan el viroplasma, y adquieren la capa externa al gemar a través de la membrana del retículo endoplásmico (RE). Durante el proceso de gemación los virus son envueltos por una membrana lipídica transitoria que se pierde conforme las partículas migran dentro del RE y ésta es reemplazada por la capa de proteínas (VP7 y VP4) a través de un mecanismo que se desconoce aún. Los viriones maduros son liberados de la célula por lisis (18).

In vivo, los rotavirus tienen un tropismo celular específico; la infección viral sólo se lleva a cabo en los enterocitos diferenciados de las vellosidades del intestino delgado (19). *In vitro*, la infección eficiente por rotavirus está restringida a una variedad de líneas celulares epiteliales de origen renal (por ejemplo, MA104 de riñón de mono), e intestinal (por ejemplo, células de cáncer de colon, CaCo-2).

Se sabe que la unión o adsorción inicial, el ensamble y la liberación de partículas no son el principal determinante de la susceptibilidad de una célula a la infección, dado que diversas líneas celulares poco susceptibles, son capaces de unir virus y de generar progenie viral cuando el virus se introduce por lipofección, de forma tan eficientemente como en las células permisivas (3). Estas observaciones sugieren que la penetración del virus a través de la membrana es el paso limitante de la infección, debido probablemente a que las células poco susceptibles carecen de algunas de las moléculas responsables de la internalización del virus.

Interacción virus célula: adsorción y penetración

Adsorción

Los receptores virales son uno de los determinantes de rango de huésped y de tropismo celular; la unión del virus a la célula puede ser un proceso de varios pasos, en los que el virus se une a más de una molécula celular. Estos receptores múltiples pueden actuar en conjunto para modular o complementar sus funciones, pero también pueden ser pasos secuenciales en los que la unión del virus a un primer receptor puede inducir cambios conformacionales que le permiten unirse al siguiente receptor (37).

Entre los rotavirus, las dos proteínas de la capa externa VP4 y VP7 han sido asociadas al proceso de adsorción a la célula hospedera (4, 25, 26); sin embargo, los resultados más recientes favorecen a VP4 como la proteína viral responsable de la adsorción del virus a la célula

La unión de algunos rotavirus de origen animal con su célula huésped se lleva a cabo a través de la interacción del virus con ácido siálico (AS) que está presente en la superficie de la célula, ya que el tratamiento de las células con neuraminidasa (enzima que remueve AS de la membrana) o la preincubación pre-incubación del virus con la glicoforina (glicoproteína con alto contenido de residuos de AS), se reduce la unión del virus a la célula en forma significativa, con la

consecuente reducción en la infectividad viral. Es por esto que se ha sugerido que el receptor para algunos rotavirus animales es un compuesto celular que contiene ácido siálico (AS) (25, 48, 84).

A diferencia de los rotavirus aislados de animales, la mayoría de los rotavirus aislados de humanos, no requieren la presencia de AS en la superficie de la célula (al menos AS del tipo que requieren los rotavirus de origen animal), ya que el tratamiento de las células con neuraminidasa no afecta la unión ni la infectividad de estos virus. Hasta la fecha no se sabe que moléculas celulares contienen los AS que unen a cada una de las diferentes cepas de rotavirus de origen animal, aunque se tienen algunas observaciones que sugieren que el gangliósido GM1 une dos cepas humanas (Kun y Mo) (8) y que el gangliósido GM3, aislado de enterocitos de cerdo, une una cepa porcina (OSU) (25, 48, 84). Dado que tanto los rotavirus de origen humano como los de origen animal infectan a los mismos tipos celulares, se ha sugerido que independientemente del requerimiento inicial por AS, la ruta que siguen estos virus para infectar a las células es la misma y que se trata de pasos secuenciales que finalmente convergen en la misma molécula que les permite penetrar al citoplasma. La interacción de la cepa RRV de rotavirus de simio con AS se lleva a cabo a través de la proteína VP8, específicamente a través de una región que involucra los aminoácidos Tyr 155, Tyr 188 y Ser 190 (43).

A partir de la cepa de rotavirus de simio RRV, dependiente de AS, en nuestro laboratorio se han aislado variantes que ya no requieren la presencia de AS en las células para infectarlas y por lo tanto son resistentes al tratamiento con neuraminidasa (llamadas nar, "neuraminidase resistant").

El fenotipo de independencia al AS segrega con el gene 4, que codifica para la proteína VP4. La secuenciación del gene de VP4 de las mutantes nar, reveló los siguientes cambios en comparación con el gene silvestre: L37→P, K187→R y Y267→C. El análisis de secuencia de los virus revertantes de una de las variantes nar, mostró que el cambio K187→R es indispensable para mantener el fenotipo AS independiente (61).

El aislamiento y caracterización de las variantes nar ha permitido proponer que la primera interacción de los rotavirus con AS no es esencial y que existen otras interacciones, posteriores a la interacción con AS que son necesarias para que el virus ingrese a la célula.

La unión del virus RRV a la célula se puede bloquear utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos contra VP8, pero no con anticuerpos contra VP5 o VP7. Por otra parte, la unión de la variante nar3 no se bloquea con anticuerpos contra VP8, sin embargo, la infectividad de ambos virus (nar3 y RRV) es bloqueada por Acs monoclonales dirigidos contra VP5. Esto sugiere que los rotavirus tienen, al menos, dos dominios de unión a la célula, uno en VP8 que interacciona con alguna molécula que contiene AS, y otro en VP5 que se une a otro receptor de manera siálico-independiente (86).

Ahora bien, dado que anticuerpos dirigidos contra VP5 no son capaces de inhibir la unión de RRV a la célula, pero sí su infectividad, se ha propuesto que RRV se une al AS a través de VP8 y posteriormente sufre un cambio conformacional que le permite interactuar con el segundo receptor, resistente a neuraminidasa, a través de VP5. Probablemente, el virus mutante ya posee este cambio conformacional y no requiere de la primera interacción con AS, uniéndose directamente con el segundo receptor, AS-independiente (86).

Experimentos de competencia entre rotavirus de diferente origen apoyan la idea de que la penetración del virus a la célula es un proceso de varios pasos; en nuestro laboratorio se encontró que el virus de origen humano Wa, es capaz de competir la infectividad del virus animal YM y de la variante nar3, pero ninguno de éstos fue capaz de competir la infectividad de Wa (62). Posiblemente, el virus humano Wa se une a una molécula celular que es necesaria para la infectividad de los virus YM (AS-dependiente) y nar3, en un paso posterior a la unión inicial, y esto podría representar un paso común en la infección de todos los rotavirus.

Basados en los experimentos de competencia entre los rotavirus YM, nar3 y Wa y los eventos de unión que se han descrito para RRV y nar3, se han propuesto tres pasos en el proceso de unión del virus a la célula hospedera: primero, la unión a AS por algunos rotavirus como RRV a través de la proteína VP8; segundo, la unión al segundo receptor resistente a neuraminidasa, a través de la proteína VP5, como lo hace nar3; el tercer paso, se piensa que estaría definida por el sitio de unión de los virus de origen humano como la cepa Wa, aunque aún no se ha definido que proteínas celulares y virales estarían involucradas en este paso.

Penetración.

En una infección viral, el paso siguiente a la unión es la entrada del virus al citoplasma celular o penetración. Se conocen tres mecanismos por los cuales un virus puede atravesar la membrana de una célula susceptible: a) Penetración directa a través de la membrana plasmática; b) Endocitosis mediada por receptor y c) Fusión directa con la membrana plasmática (7).

a) Penetración directa. En general, se desconoce el mecanismo molecular de la penetración directa y como es que el virión cruza la membrana plasmática y se libera al citoplasma. Sin embargo, este mecanismo ha sido descrito para algunos virus como adenovirus, poliovirus y las partículas subvirales intermediarias (ISVS's) de reovirus (7).

b) Endocitosis mediada por un receptor. En esta vía, los virus después de unirse a su receptor específico en la superficie de la célula son endocitados. Ejemplos de virus que dependen de este sistema para entrar a la célula son: VSV, Sindbis e Influenza. El virus de la influenza requiere del ambiente ácido de los endosomas para sufrir cambios conformacionales en la glicoproteína viral (HA). Estos cambios son necesarios para fusionar la membrana viral con la membrana endosomal y poder liberar el genoma viral al interior de la célula (7, 59).

c) Fusión directa. Algunos virus provistos de cubierta lipídica fusionan su envoltura con la membrana plasmática para penetrar. La actividad de fusión en estos virus es catalizada por glicoproteínas virales, homo o hetero-oligoméricas. Estas proteínas de fusión son sintetizadas como precursores, por lo que requieren de un corte proteolítico específico para poder llevar a cabo su función. El corte expone una secuencia hidrofóbica responsable de interactuar con la membrana blanco (59). En general, estas proteínas virales son transmembranales, su extremo amino terminal está orientado extramembranalmente y contienen en su secuencia una o más héptadas de leucina que pueden formar una estructura de "coiled coil" (29). Se ha observado que los virus con membrana lipídica, por lo general, fusionan su envoltura con la membrana plasmática de células o con la membrana endosomal; mientras que los virus no envueltos, teóricamente pueden atravesar la membrana plasmática de manera directa, luego de interactuar con su(s) receptor(es) en la superficie de la célula

El mecanismo por el cual los rotavirus penetran a la célula no ha sido esclarecido aún, aunque algunos estudios de microscopía electrónica apoyan dos mecanismos:

1) Endocitosis mediada por receptor, se basa en la observación de partículas virales en "coated pits" y endosomas secundarios (55, 65).

2) Penetración directa, se basa en la observación de que los rotavirus tratados con tripsina se encuentran en el citoplasma, fuera de vesículas endosómicas y sólo son internalizadas partículas de doble capa, es decir, que están desprovistos de la capa externa. En cambio, los virus no cortados, o neutralizados con anticuerpos contra VP4 y VP7, se observan en el interior de vesículas fagocíticas y lisosomas tardíos, en este caso, los componentes de la capa externa sí se internalizan (26, 77, 78). También se ha observado que los virus activados con tripsina tienen un tiempo medio ($t_{1/2}$) de internalización de 3 a 5 minutos y son infecciosos. En contraste, los virus sin activar con tripsina desaparecen de la membrana celular con un $t_{1/2}$ de internalización de 30 a 50 minutos y no son infecciosos (46). Por todo lo anterior, se propone que los rotavirus cortados con tripsina son infecciosos y penetran rápidamente por la vía directa; mientras que los virus sin cortar penetran por la vía endocítica y no dan lugar a una infección productiva (46, 77, 79). A pesar de lo anterior, no existen pruebas directas que indiquen de manera inequívoca el mecanismo de penetración de estos virus.

Moléculas celulares implicadas en el proceso de entrada de los rotavirus

Como se ha mencionado, existen varios componentes de la membrana celular que podrían estar involucrados en la unión y penetración de los rotavirus. Así, se han propuesto moléculas tales como los monosialogangliósidos en enterocitos de cerdo (68), la GM1 en células MA104 (67) y las glicoproteínas de 300-330 kDa en enterocitos de ratón (4). Sin embargo, no se ha demostrado

c) Fusión directa. Algunos virus provistos de cubierta lipídica fusionan su envoltura con la membrana plasmática para penetrar. La actividad de fusión en estos virus es catalizada por glicoproteínas virales, homo o hetero-oligoméricas. Estas proteínas de fusión son sintetizadas como precursores, por lo que requieren de un corte proteolítico específico para poder llevar a cabo su función. El corte expone una secuencia hidrofóbica responsable de interactuar con la membrana blanco (59). En general, estas proteínas virales son transmembranales, su extremo amino terminal está orientado extramembranalmente y contienen en su secuencia una o más héptadas de leucina que pueden formar una estructura de "coiled coil" (29). Se ha observado que los virus con membrana lipídica, por lo general, fusionan su envoltura con la membrana plasmática de células o con la membrana endosomal; mientras que los virus no envueltos, teóricamente pueden atravesar la membrana plasmática de manera directa, luego de interactuar con su(s) receptor(es) en la superficie de la célula

El mecanismo por el cual los rotavirus penetran a la célula no ha sido esclarecido aún, aunque algunos estudios de microscopía electrónica apoyan dos mecanismos:

1) Endocitosis mediada por receptor, se basa en la observación de partículas virales en "coated pits" y endosomas secundarios (55, 65).

2) Penetración directa, se basa en la observación de que los rotavirus tratados con tripsina se encuentran en el citoplasma, fuera de vesículas endosómicas y sólo son internalizadas partículas de doble capa, es decir, que están desprovistos de la capa externa. En cambio, los virus no cortados, o neutralizados con anticuerpos contra VP4 y VP7, se observan en el interior de vesículas fagocíticas y lisosomas tardíos, en este caso, los componentes de la capa externa sí se internalizan (26, 77, 78). También se ha observado que los virus activados con tripsina tienen un tiempo medio ($t_{1/2}$) de internalización de 3 a 5 minutos y son infecciosos. En contraste, los virus sin activar con tripsina desaparecen de la membrana celular con un $t_{1/2}$ de internalización de 30 a 50 minutos y no son infecciosos (46). Por todo lo anterior, se propone que los rotavirus cortados con tripsina son infecciosos y penetran rápidamente por la vía directa; mientras que los virus sin cortar penetran por la vía endocítica y no dan lugar a una infección productiva (46, 77, 79). A pesar de lo anterior, no existen pruebas directas que indiquen de manera inequívoca el mecanismo de penetración de estos virus.

Moléculas celulares implicadas en el proceso de entrada de los rotavirus

Como se ha mencionado, existen varios componentes de la membrana celular que podrían estar involucrados en la unión y penetración de los rotavirus. Así, se han propuesto moléculas tales como los monosialogangliósidos en enterocitos de cerdo (68), la GM1 en células MA104 (67) y las glicoproteínas de 300-330 kDa en enterocitos de ratón (4). Sin embargo, no se ha demostrado

directamente que los gangliósidos o estas glicoproteínas participen directamente como receptores virales.

Recientemente Coulson (13) encontró que las integrinas $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha x\beta 2$ están involucradas en la unión y/o penetración de los rotavirus a la célula, ya que los Acs contra estas integrinas, o péptidos sintéticos que contienen las secuencias típicas de ligandos a estas integrinas, son capaces de inhibir la infectividad de los rotavirus hasta en 30%.

Durante el desarrollo del presente trabajo encontramos que las proteínas integrina $\beta 3$, hsc70 de choque térmico y la proteína isomerasa de puentes disulfuro (PDI-like Erp57), están involucradas en el proceso de adsorción y penetración de los rotavirus. A continuación se describen algunas de sus características.

Integrinas

Las integrinas son moléculas heterodiméricas formadas por las cadenas α y β asociadas de manera no covalente. La cadena α varía en tamaño entre 120 y 180 kDa y la cadena β entre 90 - 110 kDa. Se conocen 8 cadenas β y 14 cadenas α . Aunque en teoría, las diferentes combinaciones $\alpha\beta$ podrían dar más de 100 heterodímeros, se sabe que la gama de combinaciones no es tan amplia dado que muchas cadenas α pueden asociarse sólo con una cadena β , aunque también varias cadenas α ($\alpha 4$, $\alpha 6$, αv y quizás otras) pueden asociarse con más de una cadena β ; la subunidad αv es particularmente promiscua a este respecto (42). En mamíferos, el mRNA de varias integrinas sufre procesamiento ("splicing") alternativo en los dominios citoplasmáticos, por ejemplo, $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 4$, $\alpha 3$ y $\alpha 6$, lo que ocasiona mayor variabilidad entre los heterodímeros.

Con el término integrinas se quiso reflejar el papel que tienen estas proteínas al integrar la matriz extracelular con el citoesqueleto (32). Estas proteínas participan en la adhesión de la célula a la matriz extracelular, aunque también están implicadas en la proliferación, migración, diferenciación, esparcimiento y sobrevivencia de las células (11, 42, 71). Las integrinas se expresan en una gran variedad de células y muchas células expresan varias integrinas.

Algunas integrinas unen más de un ligando y un ligando puede unirse a más de una integrina. Por ejemplo, proteínas que tienen la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD) tales como fibronectina, vitronectina y colágeno tipo VI, entre otras, son reconocidas por varias integrinas ($\alpha 5\beta 1$, $\alpha IIb\beta 3$, y muchas $\alpha v\beta$) (42, 73). Sin embargo, vitronectina también puede unirse a $\alpha v\beta 5$

a través de una secuencia básica, además de la secuencia RGD (81); α I**Ib** β 3 reconoce además, la secuencia KQAGDV en fibrinógeno. Otras integrinas reconocen diferentes secuencias como ligando; así, α 2 β 1 une DGEA en colágeno tipo I, α 4 β 1 une EILDV en un segmento alternativo de fibronectina y α x β 2 une GPRP en fibrinógeno. La mayoría de los ligandos que se unen a las integrinas son proteínas de la matriz extracelular.

Las evidencias se inclinan a señalar que en las dos cadenas $\alpha\beta$, los sitios de unión a ligando yacen en, o están cerca, de la cara interna del sitio de contacto entre las dos cadenas (32, 42, 71).

Las integrinas son glicoproteínas membranales que contienen un sólo segmento transmembranal hidrofóbico y son resistentes a proteólisis en células intactas. En muchas integrinas el segmento citoplasmático es corto (50 amino ácidos o menos) excepto β 4 que tiene más de 1000 aminoácidos. Las integrinas tienen una cabeza globular compuesta por cada una de las asas formada por cada cadena α y β . Todas las cadenas β tienen cuatro segmentos plegados repetidos, ricos en cisteína, por lo que se cree están unidos por puentes disulfuro. El extremo amino terminal de 40-50 kDa está fuertemente plegado formando un asa con puentes disulfuro y contribuye al dominio de unión de los ligandos. Todas las cadenas α contienen un segmento homólogo con siete plegamientos repetidos; las últimas tres o cuatro repeticiones contienen la secuencia Asp-x-Asp-x-Asp-Gly--x-x-Asp, o secuencias relacionadas, que probablemente contribuyen con las propiedades que tiene esa cadena de unir cationes divalentes.

Los cationes divalentes (Ca^{++} , Mg^{++} , Mn^{++}), son esenciales para la función de adhesión de las integrinas (40, 50, 74). La naturaleza de los cationes puede afectar la afinidad y la especificidad de unión a los ligandos, además de ser necesarios para la asociación de las cadenas α y β en algunos casos. Por ejemplo, el fibrinógeno se une a α I**Ib** β 3 de manera rápida en presencia de Ca^{++} , pero el Ca^{++} no asocia fibrinógeno a α v β 3. En cambio, Mn^{++} permite la unión de fibrinógeno a las dos integrinas. La porción que une cationes divalentes de la cadena α también contribuye a la unión de los ligandos (32, 42). Se ha sugerido que las integrinas poseen diferentes sitios de unión para los cationes y que éstos influyen en los cambios conformacionales de las integrinas y así regulan la unión con su ligando. Por ejemplo, la proteína osteopontina, que posee una secuencia RGD, está presente en la leche y en áreas de crecimiento óseo, se une a α v β 3 en presencia de Mn^{++} pero esta unión se inhibe en presencia de Ca^{++} (74).

Los dominios citoplasmáticos de las integrinas interactúan principalmente con proteínas del citoesqueleto. Las diferentes cadenas α varían en la secuencia citoplasmática, lo que hace suponer que diferentes receptores para un ligando determinado puedan diferir en su asociación con el citoesqueleto. Por ejemplo, $\alpha 5\beta 1$ está en los contactos focales mientras que $\alpha 3\beta 1$ no lo está, aunque ambas interactúan con fibronectina. Similarmente, $\alpha v\beta 3$ está en los contactos focales, mientras que $\alpha v\beta 5$ no, aunque ambas interactúan con el sitio RGD de la vitronectina (42, 73). Esto significa que diferentes cadenas de integrinas pueden mediar una respuesta celular diferencial, en respuesta a un ligando extracelular común.

Dada la amplia variedad de integrinas, cada célula puede variar sus propiedades adhesivas mediante la expresión diferencial de las integrinas. Por ejemplo, las integrinas $\alpha IIb\beta 3$ se expresan solamente en plaquetas, mientras que las integrinas $\alpha v\beta 3$ se expresan en una amplia variedad de tejidos (32, 73). Además, la célula puede modular las propiedades de unión a las integrinas. Por ejemplo, $\alpha 2\beta 1$ en plaquetas, une específicamente colágeno y no une laminina, mientras que cuando está en otras células puede reconocer ambos ligandos.

Además de sus funciones en una célula normal, las integrinas son moléculas importantes durante el ciclo de replicación de ciertos virus, al interactuar con productos virales. La proteína Tat del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (32) interactúa con $\alpha v\beta 5$ de manera independiente de RGD (81). Otros virus como el virus de la fiebre aftosa ("foot-and-mouth disease virus", FMDV) (52), adenovirus (82), (33) y echovirus (5) contienen la secuencia RGD, a través de la cual interactúan con integrinas. La interacción de los adenovirus con $\alpha v\beta 3$ es esencial para la entrada de los virus a la célula. La interacción de echovirus con $\alpha 2\beta 1$ es independiente del estado de activación de $\alpha 2\beta 1$ y del catión divalente. Hantavirus, un virus de la familia *Bunyaviridae*, se une y probablemente ingresa a la célula a través de su interacción con la integrina $\alpha IIb\beta 3$ o $\alpha v\beta 3$ (27, 28); la entrada de este virus es independiente del catión divalente y el péptido RGD no bloquea la infectividad. Recientemente, se encontró que las dos proteínas de la capa externa de los rotavirus, VP4 y VP7, contenían motivos de unión a integrinas en su secuencia. VP4 contiene la secuencia DGE, característica de ligandos que unen a la integrina $\alpha 2\beta 1$; VP7, por otro lado, contiene la secuencia GPR, ligando de las integrinas $\alpha x\beta 2$ y la secuencia LDV, ligando de las integrinas $\alpha 4\beta 1$. De acuerdo a esto, se demostró que anticuerpos contra las integrinas $\alpha 2$, $\beta 2$, y

$\alpha 4$, al igual que péptidos que mimetizan los sitios ligando, bloquean la infectividad de una cepa de rotavirus de simio (SA11) y una cepa aislada de humanos (RV5) (13). Se demostró, además, que las integrinas $\alpha 2\beta 1$ y $\alpha 4\beta 1$ pueden mediar la unión y entrada de los rotavirus SA11 en la línea celular K562 (38).

HSC70

Los organismos vivos responden a estímulos de estrés aumentando la síntesis de un grupo de proteínas colectivamente llamadas proteínas de estrés. El estrés por choque térmico ha sido el más estudiado y en este caso, las proteínas que se inducen se han denominado genéricamente como proteínas de choque térmico o hsp's (por sus siglas en inglés "heat shock protein"). Estas proteínas son ubicuas y son de las proteínas más conservadas en la naturaleza, lo cual sugiere que tienen funciones esenciales en la célula. Algunas de ellas ayudan en el plegamiento, transporte y ensamble de otras proteínas, por lo cual se les conoce como chaperonas. En procariotes las "hsp's" tienen un peso molecular entre 10 kDa y 100 kDa, y en eucariotes se han descrito las familias de hsp60, hsp70, hsp90 y la familia de las pequeñas hsps (51).

La proteína "heat shock protein" hsc70 pertenece a la familia de proteínas de choque térmico de 70 kDa (hsp's70) y se identificó primero en células sometidas a estrés, aunque posteriormente se encontró también en células no estresadas. La familia hsp70 se clasifica según la expresión de la proteína en la célula, como proteínas de expresión constitutiva que incluyen la hsc70, grp75 mitocondrial, grp78 o BIP de retículo endoplásmico, y en proteína de expresión inducible como la "heat shock protein" hsp70 y la hsp72 (51).

La hsc70 se compone de dos dominios principales: un dominio de ATPasa que tiene una estructura terciaria similar a actina (22) y un dominio carboxi-terminal que tiene una estructura secundaria similar al dominio de unión a péptidos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I (22, 23, 41, 75, 76). La proteína hsc70 se asocia transitoriamente a cadenas polipeptídicas nacientes, previniendo plegamientos prematuros o agregaciones durante la síntesis protéica; así mismo, se requiere para el traslado de polipéptidos precursores a través de las membranas de la mitocondria, del retículo endoplásmico (RE) y de lisosomas (24, 30). Además, se ha encontrado que las hsp están involucradas en la disociación de complejos protéicos, de manera dependiente de ATP (9, 54).

Los miembros de la familia hsp70 tienen diferente especificidad de sustrato, de tal manera que la proteína BIP (residente del RE) no sustituye las funciones de la hsc citoplasmática. Se sabe que la proteína hsc70 participan en el ensamble de microtúbulos *in vivo*, y están involucradas en el ensamble de filamentos de actina (36).

En bacterias, la infección con fagos lleva a un aumento en la síntesis de las proteínas de estrés tales como GroEL y DnaK, a pesar de una disminución generalizada en la síntesis total de proteínas bacterianas. Esas proteínas de estrés interactúan con componentes virales y contribuyen al ensamble correcto y a la replicación de una variedad de bacteriófagos como λ , T4 y T5. Durante la infección en células eucarióticas, una gran variedad de virus como adenovirus, herpesvirus, alfavirus, paramyxovirus, rhabdovirus, citomegalovirus (CMVs) y poxvirus (45) inducen una respuesta de estrés que conduce a un aumento en la síntesis de mRNA's que codifican para las proteínas de estrés, con la consecuente producción de éstas. En la mayoría de los casos las proteínas inducidas pertenecen a la familia de las hsp60, hsp70 y hsp90, aunque las proteínas inducidas y el mecanismo por el cual se inducen dependen del virus y del tipo de célula infectada. Algunos virus pueden directamente aumentar la expresión de los genes de estrés; por ejemplo, en adenovirus la proteína viral E1A induce la síntesis de hsp70 actuando directamente como un trans-activador transcripcional (45). En infecciones con algunos virus como vaccinia, se anulan la transcripción de la mayoría de los mRNA celulares, en tanto que la transcripción y la traducción de la mayoría de los genes de las proteínas de estrés continúan (45). La infección por adenovirus lleva a un bloqueo en el transporte de muchos mRNAs desde el núcleo al citoplasma; sin embargo, no se afecta el transporte de los mRNA's de las hsp70, los cuales se acumulan en el citoplasma a una velocidad normal. En infecciones por rotavirus, que abate severamente la síntesis de proteínas celulares, se ha observado que las proteínas BIP (GRP78) y GRP94 no se ven afectadas (83). Estos estudios sugieren que muchos virus, incluyendo aquellos que disminuyen la transcripción y traducción en la célula infectada, permiten la expresión de las proteínas de estrés en niveles normales o aumentados (45), probablemente porque se requieren para su replicación y/o ensamble. De acuerdo con lo anterior, en muchos sistemas se ha demostrado la asociación entre componentes virales y proteínas de estrés. La proteína hsp70 se asocia con el precursor P1 de poliovirus ("capsid-assembly intermediates") y coxsackievirus en células infectadas (57). Durante la infección con vaccinia, la proteína hsp70 coprecipita con proteínas de vaccinia y la cantidad de hsp70 asociada con las proteínas virales correlaciona directamente con los niveles de expresión de los genes virales. Esto sugiere que hsp70 puede actuar como una chaperona en el ensamble del virus vaccinia. Del mismo modo, se ha observado que después de adaptar fibroblastos embrionarios humanos a altas temperaturas e infectarlos con citomegalovirus, la producción de viriones se aumenta. Esto también apoya la idea que las proteínas de estrés, inducidas por el calor, ayudan durante la replicación viral (45).

Por otra parte, se ha reportado que la hsc70, detectada en la superficie celular por citometría de flujo, actúa como receptor celular para la formación de sincicios inducidos por el retrovirus

HTLV-1 en células MOLT-4 (69), ya que anticuerpos monoclonales (Ac M) contra hsc70 bloquean la formación de sincicios inducida por HTLV-1.

Aunque las principales funciones que se han descrito para hsc70 son citoplasmáticas, y se desconoce aún cómo esta proteína se transporta y se ancla en la membrana. A este respecto se ha encontrado por citometría de flujo e inmunofluorescencia, que la proteína hsc70 está en la superficie de la membrana citoplasmática de algunas líneas celulares y células tumorales (39). (64). (10), (6), espermatozoides y células germinales durante el desarrollo del testículo (58), así como en células normales luego de someterlas a choque térmico (66).

Aunque se desconoce aún cómo está unida la hsc70 a la membrana citoplasmática, dado que no tiene dominios transmembranales, se ha observado que esta proteína se une de manera específica a sulfogalactosilceramida y sulfogalactosilglicerolípido (58), lo que ha permitido especular que la hsc70 podría estar anclada en membrana citoplasmática a través de glicosfingolípidos.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Al momento de iniciar el presente trabajo no se tenía conocimiento de que clase de moléculas estaban implicadas en el proceso de entrada de los rotavirus a la célula, es decir, no se tenía certeza de la naturaleza bioquímica del posible receptor. Habían evidencias sobre el papel que pudiesen tener los glicoesfingolípidos a través del ácido siálico, pero había incertidumbre del papel de las proteínas. Se sabía que la infección *in vitro* por rotavirus estaba restringida a una variedad de líneas celulares epiteliales de origen renal, (p.e MA104), e intestinal, (p.e. CaCo-2). Se sabe que muchos rotavirus de origen no humano se unen a una molécula de la superficie celular que contiene ácido siálico (AS) y que el tratamiento de las células con neuraminidasa, para retirar el AS, o la incubación del virus con sialoglicoproteínas, (p.e. la glicoforina), se reduce la unión y la infectividad del virus a la célula.

A diferencia de los rotavirus animales, no es claro si los rotavirus de origen humano se unen a células permisivas a través de una molécula independiente de ácido siálico o si requieren igualmente del AS para su unión a la célula. Por otra parte, en nuestro laboratorio, se aislaron variantes a partir de la cepa de rotavirus de simio (RRV), dependiente de AS, las cuales no requieren la presencia de AS en las células para infectarlas (60). Dado que los rotavirus de origen humano y los de origen animal infectan a los mismos tipos celulares, estos datos sugerían que, aparte de la dependencia o no de AS, la ruta que seguían los virus era la misma y que se trataba de pasos secuenciales que finalmente convergen a la misma molécula celular que les permitía penetrar al citoplasma. Por estas razones, nos interesamos en identificar y aislar las moléculas independientes de AS, utilizando un rotavirus animal RRV dependiente de AS, su mutante nar3, independiente de AS y el rotavirus que infecta humanos Wa, independiente de AS.

Inicialmente nos propusimos caracterizar la naturaleza bioquímica del o los receptores de rotavirus en células MA104, que son células permisivas de la infección de los rotavirus, para determinar si esta molécula era una proteína, glicoproteína o glicolípido. Para ello empleamos dos enfoques: a) El uso de inhibidores de la glicosilación, inhibidores de la síntesis de glicolípidos y se retiró el colesterol de la membrana citoplasmática, para estudiar su efecto sobre la célula en la infectividad de RRV, nar3 y Wa, dado que el colesterol y los glicolípidos forman parte de los microdominios lipídicos o "rafts".

Se sabía que el octil glucósido (OG) al 0.2% era capaz de extraer proteínas de la superficie celular sin alterar la viabilidad de las células. Este detergente no iónico había sido útil en la búsqueda de receptores para los virus Semliki Forest, Papovavirus, virus de la estomatitis vesicular, polioma virus, SV40 y el virus de la rabia. b) Por estas razones, utilizamos el OG para identificar la naturaleza bioquímica de la(s) molécula(s) receptor(as) y aislarla(s) para su identificación por secuencia peptídica.

Del extracto de OG se aislaron cinco proteínas que tenían capacidad de inhibir la infectividad de los rotavirus. Una vez conocidas las secuencias peptídicas de cada una de las proteínas se fijaron unas preguntas para determinar si alguna de estas proteínas pudiera estar implicada en el proceso infeccioso de los rotavirus. Tales preguntas fueron:

1. Está la proteína en la superficie de la membrana citoplasmática ?. Para esto empleamos tres técnicas, citometría de flujo, inmunofluorescencia y biotinilación de proteínas de la superficie celular.

2. Anticuerpos específicos contra la proteína, al incubarlos con las células, inhiben la infección de rotavirus ?. Para ello, se utilizaron Acs monoclonales y/o policlonales contra cada una de las proteínas.

3. Al incubar la proteína soluble con los rotavirus, se bloquea la infección ?. En este caso, se emplearon proteínas comerciales y o recombinante humana, expresada en bacteria.

4. Al transfectar el gene para la proteína, se aumenta la infección de los rotavirus ?. Para responder a ésta pregunta se utilizaron células ya transfectadas que expresan establemente la proteína de interés o se transfectaron células susceptibles y poco susceptibles con el gene de interés. El desarrollo de cada una de las preguntas nos permitió proponer dos proteínas como candidatas a receptor de los rotavirus.

HIPOTESIS

Debido a que en la infección por rotavirus existe un tropismo específico a la célula y al tejido, así como restricción de hospedero, la especificidad de la infección puede estar mediada, al menos parcialmente, por la interacción entre el virus y proteínas de la membrana citoplasmática que actúan como moléculas receptoras.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Caracterización del receptor de rotavirus independiente de ácido siálico.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Caracterizar la naturaleza bioquímica del receptor de rotavirus independiente de ácido siálico, en células de mono *rhesus*, MA104.
2. Identificar y purificar la molécula receptora por métodos bioquímicos.

HIPOTESIS

Debido a que en la infección por rotavirus existe un tropismo específico a la célula y al tejido, así como restricción de hospedero, la especificidad de la infección puede estar mediada, al menos parcialmente, por la interacción entre el virus y proteínas de la membrana citoplasmática que actúan como moléculas receptoras.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Caracterización del receptor de rotavirus independiente de ácido siálico.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Caracterizar la naturaleza bioquímica del receptor de rotavirus independiente de ácido siálico, en células de mono *rhesus*, MA104.
2. Identificar y purificar la molécula receptora por métodos bioquímicos.

RESULTADOS

JOURNAL OF VIROLOGY

A publication of the American Society for Microbiology


July 20, 2000

Dr. Carlos F. Arias
Instituto de Biotecnologia
UNAM
A.P. 510-3
Colonia Miraval
Cuernavaca
Morelos 62250
MEXICO
Fax: 52-73-17-2388

Dear Dr. Arias:

Your revised manuscript, JVI 443-00 titled "Biochemical Characterization of Rotavirus Receptors in MA104 Cells", has been accepted for publication in the *Journal of Virology*. I have sent it to the ASM publications office today.

Sincerely yours,



Mary K. Estes, Ph D.
Editor

MKE:dg

Cc: ASM Publications office with enclosures

Editor

MARY K. ESTES
Division of Molecular Virology
Baylor College of Medicine
1 Baylor Plaza
Houston, TX 77030-3498
Phone: (713) 798-3583
Fax: (713) 798-3586
E-mail: meses@bcm.tmc.edu

Journals Department
American Society for Microbiology
Journals Department
1752 N Street, N.W.
Washington, DC 20036-2804
Phone: (202) 737-3600

Biochemical characterization of rotavirus receptors in MA104 cells

Carlos A. Guerrero^{1†}, Selene Zárate¹, Gabriel Corkidi², Susana López¹, and Carlos F. Arias¹

Departamento de Genética y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología¹, and Laboratorio de Procesamiento de Imágenes, Centro de Instrumentos², Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62250, Mexico

Running title: Biochemical characterization of rotavirus receptors

*Corresponding author: Carlos F. Arias, Instituto de Biotecnología/UNAM, A.P. 510-3, Colonia Miraval, Cuernavaca, Morelos 62250, México. Tel (52-73) 29-1661; Fax (52-73) 17-2388; e-mail: arias@ibt.unam.mx

[†]In academic leave from the Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia

SUMMARY

We have tested the effect of metabolic inhibitors, membrane cholesterol depletion, and detergent extraction of cell surface molecules, on the susceptibility of MA104 cells to be infected by rotaviruses. Treatment of cells with tunicamycin, an inhibitor of protein N-glycosylation, blocked the infectivity of the SA-dependent rotavirus RRV and its SA-independent variant nar3 by about 50%, while the inhibition of O-glycosylation had no effect. The inhibitor of glycolipid biosynthesis, PDMP, blocked the infectivity of RRV, nar3, and the human rotavirus strain Wa by about 70%. Sequestration of cholesterol from the cell membrane with β -cyclodextrin reduced the infectivity of the three viruses by more than 90%. The involvement of N-glycoproteins, glycolipids, and cholesterol in rotavirus infection suggests that the virus receptor(s) might be forming part of lipid microdomains in the cell membrane. MA104 cells incubated with the nonionic detergent octyl- β -glucoside (OG) lost their ability to bind rotaviruses by about 60%, the same degree to which they became refractory to infection, suggesting that OG extracts from the cell surface potential virus receptor(s). Accordingly, when pre-incubated with the viruses, the OG extract inhibited the virus infectivity by more than 95%. This inhibition was abolished when the extract was treated with either proteases or heat, but not when it was treated with neuraminidase, indicating the proteic nature of the inhibitor. Two protein fractions of around 57 and 75 kDa were isolated from the extract, and these fractions were shown to have rotavirus blocking activity. Also, antibodies to these fractions efficiently inhibited the infectivity of the viruses in untreated as well as in neuraminidase-treated cells. Five individual protein bands of 30, 45, 57, 75, and 110 kDa, which exhibited virus blocking activity, were finally isolated from the OG extract. These proteins are good candidates to function as rotavirus receptor(s).

INTRODUCTION

Rotaviruses, the leading cause of severe dehydrating diarrhea in infants and young children worldwide, are non-enveloped viruses that possess a genome of 11 segments of dsRNA contained in a triple-layered protein capsid. The outermost layer is composed of two proteins, VP4 and VP7. VP4 forms spikes that extend from the surface of the virus, and has been associated with a variety of functions, including the initial attachment of the virus to the cell membrane, and the penetration of the virion into the cell (14). Rotaviruses have a very specific cell tropism, infecting only enterocytes on the tip of intestinal villi (26), suggesting that specific host receptors must exist. In vitro, they also display a strict tropism, binding to a variety of cell lines, but infecting efficiently only those of renal or intestinal epithelium origin (15). Despite the advances in the molecular and structural biology of the virus, little is known about the rotavirus cell receptors. Some animal rotavirus strains interact with sialic acid (SA) on the cell surface, and this interaction has been shown to be a requirement for the efficient attachment and infection of the virus to susceptible cells (9, 17, 27, 34, 39, 57). Accordingly, a number of glycoconjugates have been shown to bind to and to block the infectivity of animal rotaviruses in vitro and in vivo (3, 4, 6, 17, 32, 46, 52-54, 56, 57). Some of these glycoconjugates have been suggested may play a role as possible receptors, like GM3 gangliosides in newborn piglet intestine (47), GM1 in LLC-MK2 cells (52), and 300-330 kDa glycoproteins in murine enterocytes (3). More recently, it has also been suggested that $\alpha 2\beta 1$, $\alpha x\beta 2$, and $\alpha 4\beta 1$ integrins may be involved in rotavirus cell entry (11, 24).

The binding of animal rotaviruses RRV and SA11 to a SA-containing cell receptor has been shown to be nonessential since variants whose infectivity is no longer dependent on the binding to these acid sugars have been isolated (35, 39). The secondary importance of SA as an attachment site for rotaviruses, at least under laboratory conditions of infection, is also reflected by the fact that the infectivity of most, if not all, human rotavirus (HRV) strains is not affected by the neuraminidase-treatment of cells (9, 17, 19, 41). Recently, through competition infection assays, using the SA-dependent rhesus rotavirus RRV, its SA-independent variant nar3, and the naturally neuraminidase-resistant HRV strain Wa, the existence of at least three cell surface sites involved in the interaction of rotaviruses with MA104 cells during the early steps of infection was determined (41).

In this study we used two approaches to characterize the cell surface structures that could serve as rotavirus receptors. In the first approach, MA104 cells were treated with metabolic inhibitors of glycosylation as well as glycolipid synthesis in order to determine the effects on the infectivity of rotaviruses RRV, nar3, and Wa. In the second approach, the putative receptor(s) for rotaviruses were extracted with the nonionic detergent octyl- β -glucoside (OG) under noncytolytic

conditions. The molecules present in the extract, which were shown to inhibit rotavirus infectivity when incubated with the viruses in solution, were biochemically characterized and partially purified.

MATERIAL AND METHODS

Cells and viruses. The human rotavirus strain Wa and the rhesus rotavirus RRV were obtained from Harry B. Greenberg, Stanford University, Stanford, CA. The SA-independent rotavirus RRV variant nar3 has been previously described (39, 40). All rotavirus strains were propagated in MA104 cells as described previously (13). The rhesus monkey epithelial cell line MA104 was grown in Eagle's minimal essential medium (MEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and was used for all experiments carried out in this work. BHK-21, CHO, and L929 cells were grown in MEM containing 10 % FBS. Reovirus type 1 and poliovirus type 3, Leon strain, were kindly provided by C. Ramos (CISEI, National Institute of Public Health, Cuernavaca, Mor., Mexico) and R. M. del Angel (CINVESTAV-IPN, Mexico City, Mexico).

Infectivity assay. MA104 cells in 96-well plates were washed twice with PBS, and then about 1000 focus-forming units (ffu's) of a trypsin-activated cell lysate containing rotaviruses RRV, nar3, Wa, or of control viruses, reovirus and poliovirus, were adsorbed to the cells for 45 min at 4°C. After the adsorption period, the virus inoculum was removed, the cells were washed once with PBS, MEM was added, and the infection was left to proceed for 14 h at 37°C. The infected cells were detected by an immunoperoxidase focus detection assay, using as detecting antibody a rabbit polyclonal hyperimmune serum to porcine rotavirus YM, as described previously, (33). The ffu's were counted with the help of a Visiolab 1000 station (Biocom, France). This station, which was used for both image acquisition and analysis, is configured with a Matrox Meteor RGB frame grabber and a 8295 Cohu RGB CCD color TV camera. Motorized stages Marzhauser (Germany) were adapted to an inverted Nikon Diaphot 300 microscope. The stage control unit was a Marzhauser Multicontrol MC2000, piloted by Explo (Biocom, France). Macro command files for Explo were developed in order to perform a semi-automated counting of the infected cells. In this manner, an accurate positioning in the center of each well is achieved automatically for later predefined scanning and visual counting of infected cells within a selected well area.

Treatment of MA104 cells with metabolic inhibitors. Monolayers of MA104 cells in 96-well plates were grown to confluence, either 2 µg/ml tunicamycin (Boehringer) or 2 mM benzyl N-acetyl- α -D-galactosamide (BenzylGalNAc) (Oxford Glyco Systems) in MEM was added and the cells were further incubated for either 24 h (tunicamycin) or 3 days (BenzylGalNAc). To inhibit the synthesis of glycolipids, 60%-confluent MA104 cells were treated with 25 µM d,l-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol (PDMP) (Matreya, Inc.) in MEM with 10% FBS for 3 days, replacing the medium with fresh drug daily. After treatment with the respective drug, the cells were washed twice with PBS, and then infected with rotaviruses, reovirus or poliovirus, as

described above. In order to determine the reconstitution of the cells' susceptibility to virus infection after drug treatment, the cells were washed twice with PBS at time zero, then MEM was added, and the cell monolayers were kept at 37°C. At the indicated times the cells were washed once with PBS and infected as described above. Cell viability was determined by exclusion of trypan blue (22).

The effect of tunicamycin and BenzylGalNAc on the cellular synthesis of N- and O-glycans, respectively, was evaluated by detection of sugars on immunoblots, using a digoxigenin glycan detection kit (Boehringer Mannheim, No. 1500-783). Under the treatment conditions described above, glycoconjugates were reduced by about 50 % in both tunicamycin- and BenzylGalNAc-treated cells as compared to untreated cells (not shown).

Extraction and immunochemical analyses of lipids from MA104 cells. PDMP-treated or untreated MA104 cells were harvested by centrifugation and washed twice with PBS. Total lipids were extracted essentially as described in Guo et al. (19). Thin-layer chromatography was carried out in a solvent system of chloroform/methanol/water containing 12 mM MgCl₂ (5:4:1). The plastic plate was dried for 2 h at 37°C and then soaked by capillarity in n-hexane containing 10% poly (isobutyl methacrylate) (Aldrich). The glycolipids were then detected immunochemically on the thin-layer chromatograms, as reported (30), employing the same carbohydrate detection kit described above. After treatment of MA104 cells with PDMP, as described above, the content of mono and disialogangliosides was about 30 to 40% of that found in untreated cells (not shown).

Cholesterol depletion of MA104 cell monolayers. Confluent MA104 cell monolayers in 96-well plates were washed twice with PBS and then incubated with 10 mM methyl-β-cyclodextrin (Aldrich) in PBS for 1 h at 37°C with occasional shaking. After this time the cells were washed twice with PBS and infected as described above.

To replenish the cells with cholesterol after methyl-β-cyclodextrin treatment, the drug was removed, the cells in 96-well plates were washed twice with PBS, and then the cells underwent essentially the same treatment as described by Falconer et al. (16). Briefly, 200 μl of MEM-7% fetal calf serum with or without 0.1 mM cholesterol (5-cholesten-3β-ol-3β-hydroxy-5-cholestene) (Sigma) which was freshly made in 100 % ethanol, was added per well and left for the indicated periods of time. At the end of the incubation time the cells were washed twice with MEM and infected as described above.

To determine the cholesterol content of untreated or cyclodextrin-treated MA104 cells, the cells in suspension were pelleted, then the pellet was suspended in 0.8 % OG by extensive

vortexing, and the suspension was cleared by centrifugation for 5 min at 5000 rpm in an Eppendorf centrifuge. The cholesterol present in the supernatant, or present in the cyclodextrin extract of cells, was assayed spectrophotometrically using the Boehringer Mannheim Diagnostic Kit (No. 139050). All cholesterol determinations were made in the presence of 0.2% OG.

Octyl- β -glucoside treatment of MA104 cell monolayers. Confluent MA104 cell monolayers in 96-well plates were washed twice with PBS. The cells were then incubated with 0.2% OG (Pierce) in MEM for 90 min at room temperature with occasional shaking. After this time, the cells were washed twice with PBS and infected as described above. In order to determine the cell viability and the degree of cell membrane permeabilization that may have been caused by the detergent, we evaluated the ability of the cells to exclude the vital dye trypan blue and the level of the cytoplasmic enzyme lactate dehydrogenase in the OG extract (25). Treatment of cells with 0.2% OG was shown to release less than 5% of the total lactate dehydrogenase activity. One hundred percent lysis was determined by homogenization of the cells in 0.2% OG.

Binding assay. Rotavirus binding was determined by a nonradioactive assay, essentially as described by Zárate et al. (59). Briefly, a suspension of 5×10^4 MA104 cells either untreated, previously treated with PDMP or tunicamycin, or extracted with octyl- β -glucoside (OG) or cyclodextrin, as described above, were incubated for 1 h at 4°C with 300 ng of trypsin-activated purified viruses in MEM-1% bovine serum albumin (BSA). The cell-virus complexes were washed three times with ice cold PBS containing 0.5% BSA. During the last wash, the cells were transferred to a fresh Eppendorf tube, and then lysed in 50 mM Tris [pH 7.5], 150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100. The viruses present in the lysates were quantified by an enzyme-linked immunoassay (59). In all assays, a binding control with no cells was performed.

To assay the binding blocking activity of the OG extract, 300 ng of purified virus particles were incubated with 20 μ g/ml of OG-extracted proteins for 90 min at 37°C. The virus-OG extract mixture was then added to MA104 cells in suspension and the assay was performed as described above. The blocking activity of the hyperimmune sera to the 57 and 75 kDa protein fractions (see below) was assayed by pre-incubating the MA104 cells with a 1:5 dilution of the corresponding preimmune or hyperimmune sera for 1 h at 4°C. After washing the cells with PBS the viruses were added and the assay was carried out as described above.

Effect of the OG extract on rotavirus infectivity. Confluent MA104 cell monolayers in T-flasks were washed twice with PBS/0.5 mM EDTA and left to detach in this buffer for 30 min at 37°C. The cells were counted, pelleted at 85 x g for 5 min at 4°C, resuspended at a concentration

of 2.2 to 2.5×10^7 cells/ml in MEM with 0.2% OG, and incubated with gentle shaking for 90 min at room temperature. After this time the cells were pelleted and the concentration of extracted proteins in the supernatant was determined by the method of Lowry (Bio-Rad); a typical concentration was approximately $5 \mu\text{g}$ protein/ 10^6 cells. The inhibitory activity of this extract on the infectivity of rotaviruses was measured by incubating dilutions of the extract in MEM with the virus for 90 min at 37°C . As a control, the viruses were incubated with 0.2% OG in MEM. To test for the specificity of inhibition, reovirus and poliovirus were assayed in the same manner as were rotaviruses. The biochemical nature of the inhibitory factor present in the OG extract from untreated cells was determined by boiling (95°C) for 15 min, by incubation of the extract ($50 \mu\text{g}$ of protein/ml) with 2 mg/ml of TPCCK-treated trypsin (Sigma) for 1 h at 37°C , or with 36 mU/ml of neuraminidase for 2 h at 37°C .

Preparative gel electrophoresis. The proteins extracted from about 5×10^7 cells (in 2 ml of 0.2% OG) were adjusted with non-reducing Laemmli sample buffer to give the following final concentrations: 62.5 mM Tris-HCl [pH 6.8], SDS 2%, glycerol 10%, and bromophenol blue 0.025%. These proteins were immediately loaded, without heating, in a single lane of a 3 mm-thick, 14 cm-wide, preparative 11% SDS-polyacrylamide gel. The gel was run at 8 mA until the bromophenol blue ran out of the gel. After electrophoresis, the gel was stained in 1% Coomassie blue R-250 in water (22), and slices of about 3 mm-wide were cut and minced in PBS; the proteins in the gel pieces were eluted into PBS by mild shaking for 48 h at room temperature. The eluted proteins were split in several aliquots and precipitated with five volumes of acetone, washed twice with 80% cold acetone, and dried for 1 min in a Savant evaporator. To analyze the precipitated proteins, one protein aliquot was resuspended in reducing (5% β -mercaptoethanol) Laemmli sample buffer, boiled for 3 min, and run in an 11% SDS-polyacrylamide gel. The ability of the eluted proteins to block rotavirus infectivity was tested, as described above, using a second protein aliquot resuspended in MEM with 1 mM β -mercaptoethanol. After the first round of gel purification, the protein fractions with inhibitory activity were run in a second preparative 7% polyacrylamide gel and all the Coomassie blue-stained bands were cut out again, eluted, and assayed for inhibitory activity. After three rounds of preparative gel electrophoresis, 5 protein bands, all of which blocked rotavirus infectivity, were isolated (see Fig. 8). In each case, after cutting the bands, the proteins were eluted, acetone-precipitated, and resuspended in MEM with 1 mM β -mercaptoethanol, as described above. Starting from the second preparative gel, the proteins were recovered by electroelution: the gel slices were immersed in sample buffer (2% SDS. 19.2

mM glycine, 2.5 mM Tris-base) and electroeluted in an ISCO chamber for 45 min (3 Watts) using 0.1% SDS, 192 mM glycine, 25 mM Tris base as a running buffer

Preparation of polyclonal antibodies. The proteins eluted from fractions 6 (~57 kDa) and 10 (~75 kDa) (see Fig. 5A), which were shown to have the maximal inhibitory activity for rotavirus infection, were used to immunize rabbits, as described (22). Briefly, New Zealand white rabbits (3 to 4 kg) were immunized subcutaneously with 500 µg of protein in Freund's complete adjuvant. Two booster injections were given subcutaneously at two week intervals with the same amount of protein emulsified in Freund's incomplete adjuvant. The rabbits were bled after the third immunization. A sample of serum was obtained from each animal before immunization.

The ability of the sera to block rotavirus infectivity was assayed by incubating dilutions of the sera with monolayers of MA104 cells in 96-well plates for 90 min at 37°C. The cells were washed twice with PBS and then infected as described above. The preimmune sera were used as negative controls. The hyperimmune sera were tested for their ability to recognize viruses RRV, nar3 and Wa by an ELISA, as described in Menchaca et al. (37); at the lowest dilution tested (1:100) no reactivity was found (not shown). These antisera did not inhibit the hemagglutination of RRV and nar3 (not shown).

Western immunoblot. The proteins present in the 0.2% OG extract were separated in an 11% polyacrylamide gel and transferred to nitrocellulose. The transferred proteins were incubated with the sera to the 57 and 75 kDa fractions, diluted 1:1000 in PBS. The bound antibodies were developed by incubation with protein A-peroxidase, and 3-amino-9-ethyl-carbazole (Sigma) was added as a substrate, as previously described in Arias et al. (1).

Immunofluorescence. MA104 cells grown on glass coverslips to approximately 80% confluence were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 20 min at 37°C. After this time the cells were washed twice with PBS, either permeabilized or not by incubation with PBS-0.5% Triton X-100 for 5 min at room temperature, and then washed twice with PBS with gentle swirling. The fixed cells were blocked with 1M glycine for 1 h at 37°C, washed twice with PBS, and then incubated with a 1:1000 (anti 57 kDa fraction) or 1:1500 (anti-75 kDa fraction) dilution of the sera for 90 min at 37°C. The cells were washed four times with PBS and then incubated in the dark for 1 h at 4°C with a goat anti-rabbit IgG coupled to fluorescein isothiocyanate (Dako. Co.), diluted 1:100 in PBS. The cells were washed 4 times with PBS and mounted on glass slides on 10% glycerol in PBS. The slides were analyzed using a Bio-Rad MRC-600 microscope. The preimmune sera were used as negative controls.

RESULTS

Inhibitors of N-glycosylation and glycolipid synthesis block rotavirus infection.

To assess the biochemical nature of the cellular receptor for rotaviruses, MA104 cells were treated prior to infection with specific inhibitors of glycosylation. Two inhibitors were used: tunicamycin, which blocks an early step in the N-glycosylation pathway involving transfer between UDP-GlcNAc and dolichol-1-phosphate (12), and BenzylGalNAc, which is a competitive inhibitor of the transferase (N-acetyl-a-D-galactosaminyl transferase) involved in the first step of the biosynthesis of most types of O-linked carbohydrates (5). In addition, we used the synthetic analog of ceramide, PDMP, to inhibit the biosynthesis of the glycosphingolipid precursor glucosylceramide (45). The cells pretreated with the inhibitors were then infected with either wt RRV, the neuraminidase-resistant RRV variant nar3, or with the HRV strain Wa.

Treatment of cells with 2 µg/ml tunicamycin for 24 h before infection inhibited the infectivity of rotaviruses RRV and nar3 by about 50%, while pre-incubation of the cells for three days with PDMP, the inhibitor of glycolipids synthesis, blocked the infectivity of the viruses by about 80% (RRV and Wa) or 60% (nar3) (Table 1). On the other hand, the inhibition of O-glycosylation by BenzylGalNAc had no effect on the infectivity of RRV, while it increased the infectivity of nar3 and Wa by about 50%, indicating that in conditions where the cell surface O-linked carbohydrates are decreased, these viruses infect the cell more efficiently. The total cell content of N- and O-glycoproteins was reduced by at least 50% by the corresponding inhibitory drug (not shown). The infectivity of reovirus and poliovirus, which were used as controls, was not inhibited by any of these three drugs, with poliovirus actually showing a two-fold increase in infectivity in the cells treated with tunicamycin (Table 1) as has been reported for other viruses like HIV-2 and B-lymphotropic papovavirus (28, 43).

Under the conditions employed, the inhibitors did not have a significant effect on cell protein synthesis, as judged by electrophoresis of ³⁵[S]-labeled proteins, nor in the viability of cells, as judged by trypan blue exclusion (not shown). To control for a possible non-specific, toxic effect of the drugs on the replication of rotaviruses, in a separate experiment we added the inhibitors immediately after the virus had been adsorbed for 45 min at 4°C. Under these conditions the drugs did not affect rotavirus infectivity, with the exception of rotavirus Wa, whose infectivity was decreased about 50% by tunicamycin; for this reason, this inhibition was considered to be nonspecific. The effect of the inhibitors was reversible since the cells became fully susceptible to rotavirus infection by about 20, and 24 h after removing tunicamycin and PDMP, respectively (not shown). Altogether these results suggest that glycolipids and N-glycosylated, but not O-glycosylated proteins, are important for rotavirus infection. To determine if the treatment of cells with tunicamycin and PDMP inhibited the attachment of the virus to the cell surface or if the

inhibition of infectivity occurred at a post-attachment step, we performed binding assays using cells treated with the different drugs. We found that treatment of cells with tunicamycin did not affect the binding of either of the three viruses tested, while treatment of cells with PDMP did not affect the attachment of RRV and Wa, but decreased the binding of nar3 by 54% (Table 2). This level of inhibition in the attachment of the virus to cells is very similar to the 60% inhibition in the infectivity of nar3 caused by PDMP (Table 1), which suggests that most if not all of the blockage in the infectivity of nar3 in PDMP-treated cells is due to an inhibition of the binding of this variant to the cell surface.

Infection of octyl- β -glucoside-extracted cells. As a different approach to characterize the rotavirus receptor, we used the nonionic detergent OG to extract the receptor from the cell membrane under noncytolytic conditions, as has been described for other virus receptors (2, 10, 23, 36, 49, 55). MA104 cells were incubated with 0.2% OG for 90 min at room temperature: under these conditions the cells maintained their viability and integrity, as judged by trypan blue exclusion, and the low levels of lactate dehydrogenase activity, a cytosolic marker, detected in the medium of the OG-treated cells (less than 5% of total enzyme activity). The cells extracted with the detergent were found to be about 60% refractory to infection by the three viruses tested (Table 1). As described above for the metabolic inhibitors, this effect was also found to be reversible: if the detergent was washed away after the treatment period, the cells fully regained their susceptibility for infection at about 8 h post-treatment (Fig. 1A), which most probably accounts for the time of synthesis, transport, and accumulation of the receptor in the cell membrane at the levels needed for the virus to efficiently infect the cell. Of interest, the attachment of all three viruses to OG-extracted cells was inhibited by 60 to 70% (Table 2), indicating that the reduced infectivity of the viruses in OG-treated cells might be due to a decreased ability of the virus particles to bind to the cell surface.

The OG extract inhibits rotavirus infection. Since treatment of MA104 cells with OG diminished both the ability of the viruses to attach to, and thus to infect cells, it is likely that the detergent was extracting cell surface molecules involved in the initial interaction of rotaviruses with the cell, possibly the rotavirus receptor (s). If this were the case, the molecule(s) present in the OG extract could interact with the virus in solution, preventing the binding of the virus to the cell membrane, and thus blocking its infectivity. We found that incubation of the OG extract with either of the three rotavirus strains, indeed blocked their infectivity in a concentration-dependent manner (Fig. 1B). At the maximum concentration tested, 400 μ g/ml of protein, the infectivity of the viruses was inhibited by about 95%, with a 50% inhibition achieved with about 40 μ g/ml of protein. In contrast, the infectivity of poliovirus and reovirus was not affected by the extract (Fig.

1B). These results strongly suggest a specific interaction of the viruses with the OG-solubilized cell surface molecules. Pre-incubation of the viruses with a solution of 0.2% OG did not affect their infectivity. The infectivity in the presence of OG was taken as the 100% value for each virus.

The inhibition of rotavirus infectivity caused by the OG extract seems to be due to a blockage in cell attachment since pre-incubation of the viruses with 20 µg/ml of the OG-extracted protein prevented the cell binding of RRV by 40%, of nar3 by 41%, and of Wa by 43% (Table 3). These figures are in close resemblance to the degree of inhibition of infectivity achieved with this concentration of extract (see Fig. 1B).

The inhibitory capacity of OG extracts obtained from BHK, CHO, and L cells, which are about 1000-fold less susceptible to rotavirus infection than MA104 cells, was determined. As can be seen in Fig. 2, the OG extracts from the three poorly permissive cells showed some inhibitory activity, although in all cases this activity was less pronounced than that observed with the extract from MA104 cells.

Biochemical nature of the inhibitory component present in the MA104 OG cell extract. To determine the biochemical nature of the inhibitory component present in the OG cell extract, we tested the effect of heat inactivation, neuraminidase, and proteolytic treatment on the inhibitory activity of the extract. We found that either boiling for 15 min or treatment with trypsin, completely abolished the inhibitory activity, while treatment with neuraminidase had no effect on the blocking capacity of the extract (Fig. 3). These results indicate that the inhibitory component of the extract is a protein.

The profile of proteins extracted with OG is shown in Fig. 4A, lane 5. Treatment with either tunicamycin or PDMP, or with neuraminidase modifies this profile (Fig. 4A, lanes 2-4), reflecting the modification in the carbohydrate content of glycoproteins caused by tunicamycin and neuraminidase. In the case of PDMP, this result suggests that the impaired synthesis of glycolipids alters either the transport of proteins to the plasma membrane or their extractability from the cell surface by OG. In this regard, it is of interest that the OG-extract from PDMP-treated cells failed to block rotavirus infectivity (not shown), suggesting that the inhibitory proteins could not be extracted from these cells.

Cholesterol depletion of MA104 cells inhibits rotavirus infectivity. It has been proposed that glycosphingolipids, cholesterol, and proteins can interact specifically in cell membranes to form microdomains, termed rafts (46). Given the involvement of glycolipids and N-glycosylated proteins on rotavirus infectivity, we tested if depletion of the cell cholesterol would have any effect on virus infectivity. For this, we incubated the cells with 10 mM β-cyclodextrin for

1 h at 37°C, which has been shown to selectively extract cholesterol from the plasma membrane, in preference of other membrane lipids (28). Under these conditions about two thirds (65%) of the cell cholesterol was removed (see Material and Methods). The treatment of cells with β -cyclodextrin inhibited the infectivity of RRV, nar3, and Wa rotavirus strains by more than 90%, while it had no effect on the infectivity of reovirus and poliovirus (Table 1). Noteworthy, the binding of the three rotavirus strains was not affected (Table 2), indicating that the decrease in the cholesterol content of the cell affects virus infectivity at a post-attachment step.

The protein profile of cells treated with β -cyclodextrin was not very different from that of untreated cells (Fig. 4B, lanes 1 and 2), even though this antibiotic extracted a small amount of protein from the cells (Fig. 4B, lane 3).

To demonstrate that the depletion of cholesterol was the cause for the reduction of virus infectivity after the β -cyclodextrin-treatment, cells in 96-well plates were washed twice with MEM and then, either MEM alone, MEM-7% FBS, or MEM-7% FBS containing 0.1 mM cholesterol was added for different times. At the end of the incubation period the cells were washed twice and infected with rotaviruses. At 8h post-treatment, the cells incubated in the presence of cholesterol fully recovered their susceptibility to rotaviruses, while the cells incubated with MEM alone or MEM-7% fetal calf serum were still about 80 and 50% refractory to rotavirus infection, respectively (not shown).

Fractionation of the inhibitory components present in the OG extract from MA104 cells. To characterize the proteins that block rotavirus infection, we fractionated the OG extract obtained from MA104 cells by preparative SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. After gel electrophoresis slices of a single-lane gel were cut, the proteins were eluted in PBS, concentrated by precipitation with acetone, and then the proteins were resuspended in PBS with 1 mM β -mercaptoethanol. This method has been successful for recovering proteins with enzymatic activity (20, 48). The proteins obtained from the different fractions (Fig. 5B) were tested for their ability to block rotavirus infection. Proteins eluted from two well defined regions of the gel, around 57 kDa and 75 kDa, had the ability to efficiently inhibit the infectivity of all three rotaviruses tested (Fig. 5A). The pattern of inhibition observed in Fig. 5A was found to be consistent in independent gel fractionation experiments.

Antibodies to the OG extract protein fractions inhibit rotavirus infection. Protein fractions 6 and 10 in Fig. 5A, which represent the peak of inhibitory activity, were used to immunize rabbits. The hyperimmune sera obtained against these two fractions were found to block

the infectivity of all three strains of rotavirus when pre-incubated with the cells for 90 min at 37°C prior to addition of the virus, while the preimmune sera had no effect (shown for the serum to the 75 kDa protein fraction in Fig. 6A). The inhibitory effect of the two antisera was not additive since their mixture inhibited rotavirus infectivity by about 70% at a dilution of 1/100 (not shown). Of interest, both sera blocked the infectivity of HRV Wa and that of the SA-independent variant nar3 in cells treated with neuraminidase (shown for the serum to the 75 kDa fraction in Fig. 6B), suggesting that they contain antibodies to a SA-independent rotavirus receptor. In a binding inhibition assay, the serum to the 75 kDa fraction did not inhibit the attachment of rotavirus RRV to MA104 cells, but inhibited 32% of the binding of nar3, and 72% of that of rotavirus Wa (Table 3). The blocking specificity of these antisera was confirmed by the following assays: they did not recognize any of the three viruses by ELISA and did not inhibit the hemagglutination activity of RRV and nar3. Furthermore, the sera were shown not to inhibit the infectivity of poliovirus nor that of reovirus in a focus-forming unit reduction assay as described in Material and Methods for rotavirus (not shown).

By Western blot the sera to the 75 kDa fraction recognized a protein of about 73 kDa, and to a lesser extent a protein of about 57 kDa in the 0.2% OG cell extract (Fig. 6C, lane 3). Of interest, the serum to the 57 kDa protein fraction also recognized proteins of 73 and 57 kDa, although the latter protein was recognized more efficiently than the 73 kDa polypeptide by this serum (Fig. 6C, lane 4). The preimmune sera did not recognize any of these proteins (Fig. 6C, lanes 1 and 2).

The hyperimmune sera were shown to recognize proteins on the surface of the MA104 cells, as judged by their reactivity with non-permeabilized cells by flow cytometry (not shown) and by indirect immunofluorescence (shown for the anti-75 kDa serum in Fig. 7). The pattern of immunofluorescence (for both anti 57 and 75 kDa sera) was patchy over the surface of the cell, but there was a higher concentration of the fluorescent signal on the intercellular junctions (Fig. 7A). In permeabilized cells, a weak signal mainly associated with the nuclei was found (Fig. 7B). No fluorescent signal was detected when the preimmune sera were used to stain either permeabilized or non-permeabilized cells (Fig. 7C and 7D).

Purification of the cellular proteins which block rotavirus infectivity. The proteins with rotavirus blocking activity were purified by SDS-PAGE from an OG extract obtained from MA104 cells. After three rounds of purification by gel electrophoresis, using the inhibitory activity of the proteins as marker, we were able to isolate 5 bands with molecular weights of approximately 110, 75, 57, 45, and 30 kDa (Fig. 8) which were able to inhibit the infectivity of all three rotavirus strains tested. Although these proteins consistently inhibited rotavirus infectivity through the rounds of purification carried out, the final amount of protein recovered was small, which

prevented us from determining the precise specific inhibitory activity for each protein, and testing if they were recognized by the hyperimmune sera. Table 4 shows the results of a blocking infectivity assay with the purified proteins; in this blocking assay, the same amount of protein shown in the gel of Fig. 8 was used. The relative inhibitory activity of each protein for all three viruses was found to be 75 kDa > 110 kDa > 45 kDa = 30 kDa > 57 kDa. Given the fractionation method employed, it is quite possible that each of these bands may represent more than one protein species.

DISCUSSION

The entry of rotaviruses into MA104 cells seems to be a multistep process involving interactions of the virus surface protein VP4, and maybe VP7, with more than one cell surface site present in either the same or different cellular structure(s) (11, 41).

In the present study we employed two approaches to characterize the biochemical nature of the rotavirus receptor(s): In the first approach we used metabolic inhibitors of glycosylation and synthesis of glycolipids to study their effect on the infectivity of three different rotavirus strains. We found that the inhibitor of protein N-glycosylation, tunicamycin, diminished the infectivity of rotaviruses RRV and nar3 despite their differential dependence on SA for infectivity, implying that these viruses interact with N-linked glycoproteins at some point during cell entry. The fact that the treatment of cells with this drug did not affect the binding of the viruses suggests that the blockage occurs after the initial attachment of the virion to the cell surface. Tunicamycin has been successfully employed to specifically analyze the role of N-glycans as receptors for several viruses (7, 28, 43, 44).

Treatment of MA104 cells with PDMP, an inhibitor of glycolipid biosynthesis, resulted in the more pronounced inhibition of infectivity observed for all three rotavirus strains (Table 1). Interaction of rotaviruses with gangliosides GM1 and GM3 has been reported (47, 52), and this interaction has been shown to be SA-dependent. In this case, however, the inhibition caused by PDMP seems not to be the result of a deficient attachment of the SA-dependent rotavirus RRV to the cell surface since it was not significantly affected (Table 2). This observation suggests that RRV does not interact, or at least not exclusively, with the SA present on PDMP-sensitive gangliosides. On the other hand, the binding of the SA-independent variant nar3 was decreased in PDMP-treated cells, suggesting that either glycosphingolipids, or more likely a protein whose correct transport or conformation depends on their presence, might be used by nar3 to attach to the cell. Of interest, the binding of the HRV strain Wa was not affected by PDMP, in agreement with the suggestion that nar3 and Wa, despite of both having an infectivity resistant to neuraminidase treatment of cells, bind to different cell surface sites (41). Finally, the fact that PDMP, but not tunicamycin, affected the attachment of nar3 suggests that the inhibition caused by the N-glycosylation inhibitor is not due to its reported ability to inhibit ganglioside biosynthesis (50, 58).

In addition to the involvement of N-glycosylated proteins and glycolipids on rotavirus entry, we found that cholesterol depletion inhibited the infectivity of rotaviruses by more than 90% (Table 1). These findings are of interest with regard to the recent description of functional lipid microdomains, or rafts, in the cell membrane (51). These rafts have been proposed to be composed of cholesterol, glycosphingolipids (gangliosides among others), and a specific set of associated proteins. The rafts are thought to function as specialized platforms for apical cell sorting of proteins and signal transduction. For some proteins which have been shown to form part of these lipid

microdomains (oxytocin receptor, placental alkaline phosphatase, gD1-decay accelerating factor), the disassembly of the rafts by cholesterol depletion disrupts or modifies the receptor activity, even though the receptor might be present in the same abundance on the cell membrane (21, 29). In this regard, the finding that the attachment of RRV, nar3, and Wa to cholesterol depleted cells is not affected, while their infectivity is severely impaired, is consistent with the possibility that the rotavirus receptor(s) might be forming part of some of these lipid microdomains. It is tempting to hypothesize that in cholesterol-depleted cells the receptor(s) retain their ability to bind rotavirus particles, but in order to fully promote virus entry they must be organized in a lipid microdomain. In addition, the fact that the OG extract from PDMP-treated cells failed to show inhibitory activity suggests that PDMP treatment may have disrupted lipid rafts organization such that one or more of the active proteins shown in Fig. 8 never became associated or localized within these membrane microdomains and as result are not extracted with OG. Experiments are in course to test this hypothesis.

The infectivity of the two nonenveloped viruses that were used as controls, poliovirus and reovirus, was not inhibited by the described drugs showing that the effect observed on the infectivity of rotaviruses was specific. The human poliovirus receptor is an integral membrane protein with the conserved amino acids and domain structure characteristic of members of the immunoglobulin superfamily (31, 38). The nature of the reovirus receptor is less well-defined; most of the available evidence suggest that reovirus binds to multiple sialoglycoproteins rather to a single homogeneous species on the cell surface (8, 18, 42).

In a second approach to characterize the rotavirus receptor, MA104 cells were incubated with a solution of 0.2% OG. It has been shown that at low concentrations, like the one used in this work, OG is able to extract proteins from the cell surface without impairing the viability of the cells (see results, and refs. 23, 36). This nonionic detergent has been useful to obtain the receptors for Semliki Forest virus, parvovirus, vesicular stomatitis virus, polyoma virus, SV40 virus, and rabies virus from intact cell monolayers (2, 10, 23, 36, 49, 55). MA104 cells extracted with OG lost their ability to bind rotaviruses by about the same extent (60%) they became refractory to infection, suggesting that OG extracts from the cell surface the receptor molecules needed by all three strains of rotavirus to attach and thus to infect the cell. In agreement with this finding is the fact that the OG extract, when pre-incubated with these viruses, inhibited both their binding to and infection of MA104 cells. This suggests that the putative OG solubilized cell receptors are able to interact with the viruses in solution. The inhibitory activity of the OG extract was lost by treatment with proteases and heat, but not by treatment with neuraminidase indicating that the active component is a protein.

To test for a correlation between the susceptibility of the cell line and the ability of the OG extract to inhibit rotavirus infection, we obtained OG extracts from BHK, CHO, and L cells which

are about 1000-fold less susceptible to rotavirus infection than MA104 cells. The extracts from these three cell lines inhibited the infectivity of rotaviruses to different degrees, but in general to a lower extent than that achieved with the MA104 cell extract (Fig. 2). As suggested in this work and by others (11, 41), these results might be explained if there were more than one cell surface molecule implicated in rotavirus infection, which would make possible the absence of one of the receptor molecules in the less susceptible cell lines, while other surface components, which could be extracted with OG, and block rotavirus infectivity would still be present.

Two protein fractions with blocking activity for rotavirus infectivity were obtained by gel fractionation of the MA104 cells' OG extract. The hyperimmune sera prepared against these two fractions were shown to react primarily with two polypeptides of 73 and 57 kDa. Although it is not possible to be certain if the more immunogenic proteins are the active inhibitory components of the extract, it seems at least that the inhibitory antibodies present in both hyperimmune sera recognize the same cell surface molecule or different molecules in a protein complex since the blocking efficiency of the individual sera was not an additive, and the cell surface recognition pattern obtained with both antisera was strikingly similar.

Five individual protein bands with inhibitory activity for rotavirus infectivity were isolated from the OG extract. These proteins need to be assayed to test the specificity of their inhibitory activity and to investigate if they are somehow related to each other. However, the fact that all of these proteins block the infectivity of RRV, nar3, and Wa rotaviruses, suggest that at least one of them, or a complex formed by more than one, could be a common cellular receptor for rotaviruses. The determination of the identity of these proteins should help to advance in the definition of the cell surface molecules involved in the interactions that seem to occur between rotaviruses and the cell surface during infection.

As a working hypothesis, we propose that the rotavirus receptor is likely to be a complex of several cell components including gangliosides, N-linked glycoproteins, and probably other proteins which might all associate in lipid rafts and need the lipid microdomain organization to function efficiently in the binding and internalization of rotavirus particles. The protein components of this proposed complex could include the integrin molecules that have been reported recently (11, 24).

ACKNOWLEDGMENTS

We are thankful to Rafaela Espinosa for the immunofluorescence experiments, to Pavel Isa for the flow cytometric analysis, and to Leticia Vega Alvarado for her contribution in the development of the command files to semi-automatically count infected cells. This work was partially supported by grants 75197-527106 from the Howard Hughes Medical Institute, G0012-N9607 from the National Council for Science and Technology-Mexico, and IN207496/IN201399/IN116698 from DGAPA-UNAM.

REFERENCES

1. **Arias, C. F., P. Romero, V. Alvarez, and S. López.** 1996. Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity. *J. Virol.* **70**:5832-5839.
2. **Basak, S., H. Turner, and S. Parr.** 1994. Identification of a 40- to 42-kDa attachment polypeptide for canine parvovirus in A72 cells. *Virology.* **205**:7-16.
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**:602-610.
4. **Beisner, B., D. Kool, A. Marich, and I. H. Holmes.** 1998. Characterisation of G serotype dependent non-antibody inhibitors of rotavirus in normal mouse serum. *Arch. Virol.* **143**:1277-1294.
5. **Brockhausen, I., G. Moller, A. Pollex-Kruger, V. Rutz, H. Paulsen, and K. L. Matta.** 1992. Control of O-glycan synthesis: specificity and inhibition of O-glycan core 1 UDP-galactose:N-acetylgalactosamine-alpha-R beta 3-galactosyltransferase from rat liver. *Biochem. Cell Biol.* **70**:99-108.
6. **Chen, C. C., M. Baylor, and D. M. Bass.** 1993. Murine intestinal mucins inhibit rotavirus infection. *Gastroenterol.* **105**:84-92.
7. **Chen, M. H., and T. Benjamin.** 1997. Roles of N-glycans with alpha 2,6 as well as alpha 2,3 linked sialic acid in infection by polyoma virus. *Virology.* **233**:440-442.
8. **Choi, A. H., R. W. Paul, and P. W. Lee.** 1990. Reovirus binds to multiple plasma membrane proteins of mouse L fibroblasts. *Virology.* **178**:316-320.
9. **Ciarlet, M., and M. K. Estes.** 1999. Human and most animal rotavirus strains do not require the presence of sialic acid on the cell surface for efficient infectivity. *J. Gen. Virol.* **80**:943-948.
10. **Clayson, E. T., and R. W. Compans.** 1989. Characterization of simian virus 40 receptor moieties on the surfaces of vero C1008 cells. *J. Virol.* **63**:1095-1100.
11. **Coulson, B. S., S. H. Londrigan, and D. J. Lee.** 1997. Rotavirus contains intergrin ligand sequences and a disintegrin-like domain implicated in virus entry into cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**:5389-5394.
12. **Elbein, A.** 1983. Inhibitors of glycoprotein synthesis. *Methods Enzymol.* **98**:135-155.
13. **Espejo, R., E. Martínez, S. López, and O. Muñoz.** 1980. Different polypeptide composition of two human rotavirus types. *Infect. Immun.* **28**:230-237.
14. **Estes, M. K.** 1996. Rotaviruses and their replication, p. 1625-1655. *In* B. N. Fields and D. N. Knipe and P. M. Howley and R. M. Chanock and J. L. Melnick and T. P. Monath and B. Roizman and S. E. Straus (ed.), *Virology*, vol. 2. Raven Press, New York, N.Y.

15. **Estes, M. K., and J. Cohen.** 1989. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol. Rev.* **53**:410-449.
16. **Falconer, M. M., J. M. Gilbert, A. M. Roper, H. B. Greenberg, and J. S. Gavora.** 1995. Rotavirus-induced fusion from without in tissue culture cells. *J. Virol.* **69**:5582-5591.
17. **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.
18. **Gentsch, J. R., and A. F. Pacitti.** 1987. Differential interaction of reovirus type 3 with sialylated receptor components on animal cells. *Virology.* **161**:245-248.
19. **Guo, C. T., O. Nakagomi, M. Mochizuki, H. Ishida, M. Kiso, Y. Ohta, T. Suzuki, D. Miyamoto, K. I. Hidar, and Y. Suzuki.** 1999. Ganglioside GM(1a) on the cell surface is involved in the infection by human rotavirus KUN and MO strains. *J. Biochem.* **126**:683-688.
20. **Hager, D. A., and R. R. Burgess.** 1980. Elution proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels, removal of sodium dodecyl sulfate, and renaturation of enzymatic activity: Results with sigma subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase, wheat germ DNA topoisomerase, and other enzymes. *Anal. Biochem.* **109**:76-86.
21. **Hannan, L. A., and M. Edidin.** 1996. Traffic, polarity, and detergent solubility of a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein after LDL deprivation of MDCK cells. *J. Cell Biol.* **133**:1265-1276.
22. **Harlow, E., and D. Lane.** 1988. *Antibodies, A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, USA.
23. **Helenius, A., B. Morien, E. Fries, K. Simons, P. Robinson, V. Schirmacher, C. Terhorst, and J. Strominger.** 1978. Human (HLA-A and HLA-B) and murine (H-2d) histocompatibility antigens are cell surface receptors for Semliki forest virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **75**:3846-3850.
24. **Hewish, M. J., Y. Takada, and B. S. Coulson.** 2000. Integrins $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha 4\beta 1$ can mediate SA11 rotavirus attachment and entry into cells. *J. Virol.* **74**:228-236.
25. **Johnson, M. K., and V. P. Whittaker.** 1963. Lactate dehydrogenase as a cytoplasmic marker in brain. *Biochem. J.* **88**:404-409.
26. **Kapikian, A. Z., and R. M. Chanock.** 1996. Rotaviruses, p. 1657-1708. *In* B. N. Fields and D. N. Knipe and P. M. Howley and R. M. Chanock and J. L. Melnick and T. P. Monath and B. Roizman and S. E. Straus (ed.), *Virology*, vol. 2. Raven Press, New York. N.Y.

27. **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.
28. **Keppler, O. T., M. Herrmann, M. Oppenlander, W. Meschede, and M. Pawlita.** 1994. Regulation of susceptibility and cell surface receptor for the B-lymphotropic papovavirus by N glycosylation. *J. Virol.* **68**:6933-6939.
29. **Klein, U., G. Gimpl, and F. Fahrenholz.** 1995. Alteration of the myometrial plasma membrane cholesterol content with B-Cyclodextrin modulates the binding affinity of the oxytocin receptor. *Biochem.* **34**:13784-13793.
30. **Kniep, B., and P. F. Mühlradt.** 1990. Immunochemical detection of glycosphingolipids on thin-layer chromatograms. *Anal. Biochem.* **188**:5-8.
31. **Koike, S., H. Horie, I. Ise, A. Okitsu, M. Yoshida, N. Iizuka, K. Takeuchi, T. Takegami, and A. Nomoto.** 1990. The poliovirus receptor protein is produced both as membrane-bound and secreted forms. *EMBO J.* **9**:3217-3224.
32. **Koketsu, M., T. Nitoda, L. R. Juneja, M. Kim, N. Kashimura, and T. Yamamoto.** 1995. Sialyloligosaccharides from egg yolk as inhibitor of rotaviral infection. *J. Agric. Food Chem.* **43**:858-861.
33. **Lizano, M., S. López, 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**:1383-1391.
34. **Ludert, J. E., N. Feng, J. H. Yu, R. L. Broome, Y. Hoshino, and H. B. Greenberg.** 1996. Genetic mapping indicates that VP4 is the rotavirus cell attachment protein in vitro and in vivo. *J. Virol.* **70**:487-493.
35. **Ludert, J. E., B. B. Mason, J. Angel, B. Z. Tang, Y. Hoshino, N. G. Feng, P. T. Vo, E. M. Mackow, F. M. Ruggeri, and H. B. Greenberg.** 1998. Identification of mutations in the rotavirus protein VP4 that alter sialic-acid-dependent infection. *J. Gen. Virol.* **79**:725-729.
36. **Marriott, S. J., G. R. Griffith, and R. A. Consigli.** 1987. Octyl- β -D-glucopyranoside extracts polyomavirus receptor moieties from the surfaces of mouse kidney cells. *J. Virol.* **61**:375-382.
37. **Menchaca, G., L. Padilla, M. Méndez-Toss, J. F. Contreras, F. I. Puerto, H. Guiscafré, F. Mota, I. Herrera, R. Cedillo, O. Muñoz, R. Ward, Y. Hoshino, S. López, and C. F. Arias.** 1998. Serotype specificity of the neutralizing-antibody response induced by the individual surface proteins of rotavirus in natural infections of young children. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* **5**:328-334.

38. **Mendelsohn, C. L., E. Wimmer, and V. R. Racaniello.** 1989. Cellular receptor for poliovirus: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. *Cell.* **56**:855-865.
39. **Méndez, E., C. F. Arias, and S. López.** 1993. Binding to sialic acids is not an essential step for the entry of animal rotaviruses to epithelial cells in culture. *J. Virol.* **67**:5253-5259.
40. **Méndez, E., C. F. Arias, and S. López.** 1996. Interactions between the two surface proteins of rotavirus may alter the receptor-binding specificity of the virus. *J. Virol.* **70**:1218-1222.
41. **Méndez, E., S. López, M. A. Cuadras, P. Romero, and C. F. Arias.** 1999. Entry of rotaviruses is a multistep process. *Virology.* **263**:450-459.
42. **Paul, R. W., A. H. Choi, and P. W. Lee.** 1989. The alpha-anomeric form of sialic acid is the minimal receptor determinant recognized by reovirus. *Virology.* **172**:382-385.
43. **Potempa, S., L. Picard, J. D. Reeves, D. Wilkinson, R. A. Weiss, and S. J. Talbot.** 1997. CD4-independent infection by human immunodeficiency virus type 2 strain ROD/B: the role of the N-terminal domain of CXCR-4 in fusion and entry. *J. Virol.* **71**:4419-4424.
44. **Qi, Y. M., S. W. Peng, K. Hengst, r. M. Evande, D. S. Park, J. Zhou, and r. I. H. Frazee.** 1996. Epithelial cells display separate receptors for papillomavirus VLPs and for soluble L1 capsid protein. *Virology*:35-45.
45. **Radin, N. S., J. A. Shayman, and J. I. Inokuchi.** 1993. Metabolic effects of inhibiting glucosylceramide synthesis with PDMP and other substances. *Adv. Lipid Res.* **26**:183-213.
46. **Rolsma, M. D., H. B. Gelberg, and M. S. Kuhlenschmidt.** 1994. Assay for evaluation of rotavirus-cell interactions: identification of an enterocyte ganglioside fraction that mediates group A porcine rotavirus recognition. *J. Virol.* **68**:258-268.
47. **Rolsma, M. D., T. B. Kuhlenschmidt, H. B. Gelberg, and M. S. Kuhlenschmidt.** 1998. Structure and function of a ganglioside receptor for porcine rotavirus. *J. Virol.* **72**:9079-9091.
48. **Scheele, G., J. Pash, and W. Bieger.** 1981. Identification of proteins according to biological activity following separation by two-dimensional isoelectric focusing/sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis: Analysis of human exocrine pancreatic proteins. *Anal. Biochem.* **112**:304-313.
49. **Schlegel, R., T. S. Tralks, M. C. Willingham, and I. Pastan.** 1983. Inhibition of VSV binding and infectivity by phosphatidylserine: is phosphatidylserine a VSV-binding site? *Cell.* **32**:639-646.

50. **Semmes, O. J., M. S. Sztein, J. M. Bailey, and W. D. Merritt.** 1992. Tunicamycin inhibits function and expression of the high-affinity IL-2 receptor in a murine IL-2-dependent cell line. *Int. J. Immunopharmacol.* **14**:583-593.
51. **Simons, K., and E. Ikonen.** 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature.* **387**:569-572.
52. **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
53. **Willoughby, R. E.** 1993. Rotaviruses preferentially bind O-linked sialylglycoconjugates and sialomucins. *Glycobiol.* **3**:437-445.
54. **Willoughby, R. E., and R. H. Yolken.** 1990. SA11 rotavirus is specifically inhibited by an acetylated sialic acid. *J. Infect. Dis.* **161**:116-119.
55. **Wunner, W. H., and K. J. Reagan.** 1985. Nature of the rabies virus cellular receptor. p. 152-159. *In* R.L. Crowell and K. Lonberg-Holm (ed.), *Virus attachment and entry into cells.* American Society for Microbiology. Washington, D.C.
56. **Yolken, R. H., J. A. Peterson, S. L. Vonderfecht, E. T. Fouts, K. Midthun, and D. S. Newburg.** 1992. Human milk mucin inhibits rotavirus replication and prevents experimental gastroenteritis. *J. Clin. Invest.* **90**:1984-1991.
57. **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.
58. **Yusuf, H. K., G. Pohlentz, and K. Sandhoff.** 1984. Ganglioside biosynthesis in Golgi apparatus: new perspectives on its mechanism. *J. Neurosci. Res.* **12**:161-178.
59. **Zárate, S., R. Espinosa, P. Romero, E. Méndez, C. F. Arias, and S. López.** 2000. The VP5 domain of VP4 can mediate the attachment of rotaviruses to cells. *J. Virol.* **74**:593-599.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. (A) Recovery of the susceptibility of MA104 cells to rotavirus infection after extraction with OG. Cell monolayers in 96-well plates were extracted with 0.2% OG, and allowed to recover in MEM at 37°C. At the indicated times, the monolayers were washed with PBS and infected with rotaviruses. (B) Inhibition of rotavirus infectivity by the OG extract from MA104 cells. The indicated concentrations of OG-extracted protein were incubated with the viruses for 90 min at 37°C. The virus-protein mixtures were used to infect MA104 cell monolayers in 96-well plates. In both (A) and (B), percent infectivity is referred to the infectivity of the viruses incubated in 0.2% OG. Error bars represent 1 standard error of the mean of three or more experiments carried out each in duplicate.

Fig. 2 Inhibition of rotavirus infectivity by OG extracts from cells poorly permissive to rotavirus infection. OG-extracted proteins (20 µg/ml) from CHO, BHK or L cells, or from MA104 cells (as indicated) were incubated with the viruses for 90 min at 37°C. The virus-protein mixtures were used to infect MA104 cell monolayers in 96-well plates. Percent infectivity is referred to the infectivity of the viruses incubated in 0.2% OG. Error bars represent 1 standard error of the mean of three experiments carried out each in duplicate.

Fig. 3. Biochemical nature of the inhibitory factor present in the OG extract. A 0.2% OG extract was obtained from cells in suspension. Just prior to the incubation with the virus, the extract was either boiled (95°C) for 15 min (heat), incubated with 2 mg of trypsin per ml of extract for 1 h at 37°C (trypsin), or incubated with 36 mU/ml of neuraminidase (NA). The untreated extract (no treatment) was used as positive control. Viruses and extract (100 µg of protein extract per ml of virus) were mixed and incubated for 90 min at 37°C, and then MA104 cells in 96-well plates were infected with the virus-protein mixtures. The percent infectivity is referred to the infectivity of viruses incubated with a solution of 0.2% OG in MEM (virus control). Error bars represent 1 standard error of the mean of three or more experiments carried out each in duplicate.

Fig. 4. Analysis of the proteins extracted from MA104 cells. Cell monolayers were treated with either neuraminidase, tunicamycin or PDMP, as described under Material and Methods, and the cells were then extracted with 0.2% OG for 90 min at room temperature (A). The extracted proteins were separated by electrophoresis under reducing conditions in an 11% SDS-polyacrylamide gel and silver stained. OG-extracted proteins from MA104 cells treated with neuraminidase (lane 2), tunicamycin (lane 3), PDMP (lane 4), or untreated cells (lane 5) are shown. Lane 1, molecular weight markers. (B) Cells in suspension were extracted with 10 mM β-cyclodextrin for 1h at

37°C, as described in Material and Methods. Proteins in untreated cells (lane 1), in extracted cells (lane 2), and those present in the cyclodextrin extract (lane 3) were analyzed by gel electrophoresis in a proportion 1:1:2.

Fig. 5. Inhibition of rotavirus infectivity by OG-extracted proteins fractionated by gel electrophoresis. About 250 µg of proteins extracted with 0.2% OG from MA104 cells were separated by preparative SDS-polyacrylamide gel electrophoresis under nonreducing conditions. After electrophoresis the gel was stained with Coomassie blue in water, gel slices were cut out, and the proteins eluted. A) Inhibitory activity of the eluted proteins present in the fractions shown in (B). Only the portion of the gel where inhibitory activity was found is shown; the remaining higher and lower molecular weight protein fractions had no inhibitory activity.

Fig. 6. Inhibitory activity of hyperimmune sera to OG-extracted proteins. The OG protein fractions 6 and 10 shown in Fig. 5B, containing polypeptides of around 57 and 75 kDa, respectively, were used to raise antibodies in rabbits. Serial dilutions of the preimmune (dashed lines) and hyperimmune (continuous lines) sera to the 75 kDa protein fraction were incubated with untreated (A) or neuraminidase-treated (B) MA104 cells for 90 min at 37°C before addition of the virus. Similar inhibition results were obtained with the serum to the 57 kDa protein fraction (not shown). Error bars represent 1 standard error of the mean of three or more experiments carried out in duplicate. (C) Immunoblot analysis of the OG-extracted proteins. The proteins extracted from MA104 cells with 0.2% OG were separated in an 11% SDS-polyacrylamide gel under reducing conditions and transferred to nitrocellulose. The transferred proteins were incubated with a 1000-fold dilution of the preimmune (lanes 1 and 2) or hyperimmune (lanes 3 and 4) sera to the 57 kDa (lanes 2 and 4) or 75 kDa (lanes 1 and 3) protein fractions. The bound antibodies were developed by incubation with protein A-peroxidase and a chromogenic substrate.

Fig. 7. Immunofluorescence of cells incubated with the serum to the 75 kDa OG protein fraction. MA104 cells were fixed with paraformaldehyde, and permeabilized (B and D) or not (A and C) with Triton X-100. The cells were incubated with a dilution 1:1500 of the preimmune (C and D) or hyperimmune (A and B) sera to the 75 kDa protein fraction for 90 min at 37°C followed by staining with a goat anti-rabbit IgG coupled to fluorescein isothiocyanate.

Fig. 8. Isolated proteins with inhibitory activity for rotavirus infectivity. The protein bands that were shown to block rotavirus infectivity after three rounds of purification by preparative gel

electrophoresis (see Table 4) were analyzed in an 11% polyacrylamide gel under reducing conditions. The protein bands were detected by silver-staining.

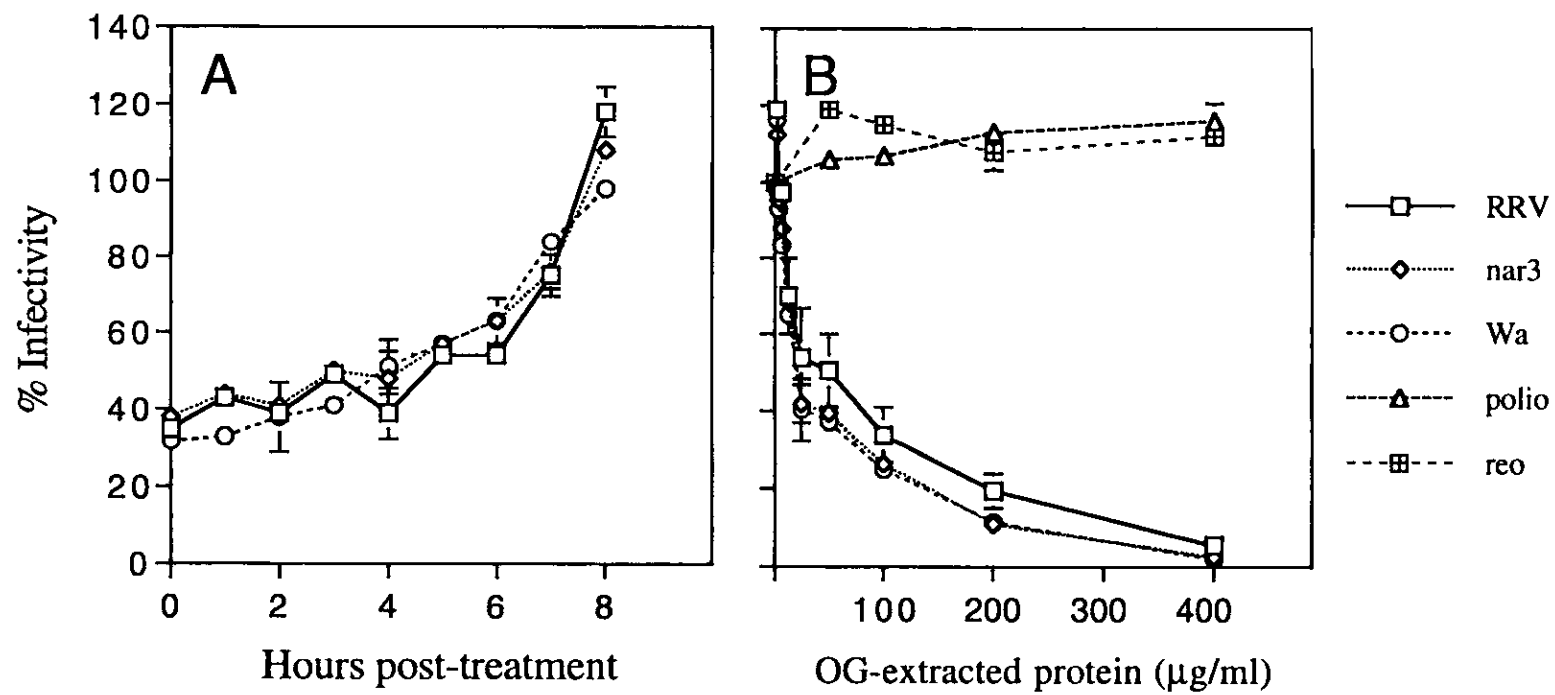


Figure 1

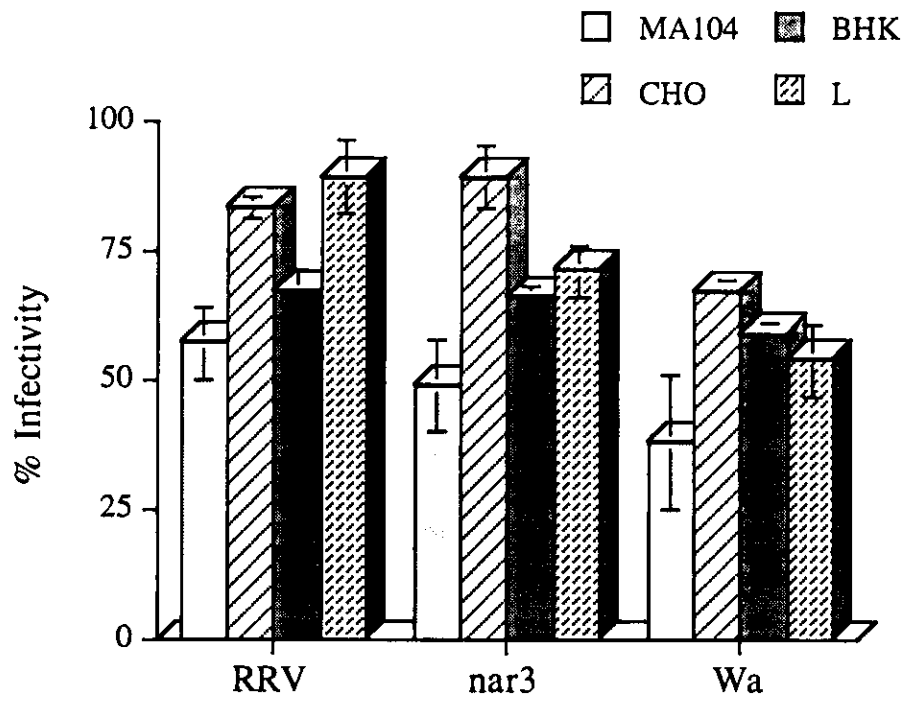


Figure 2

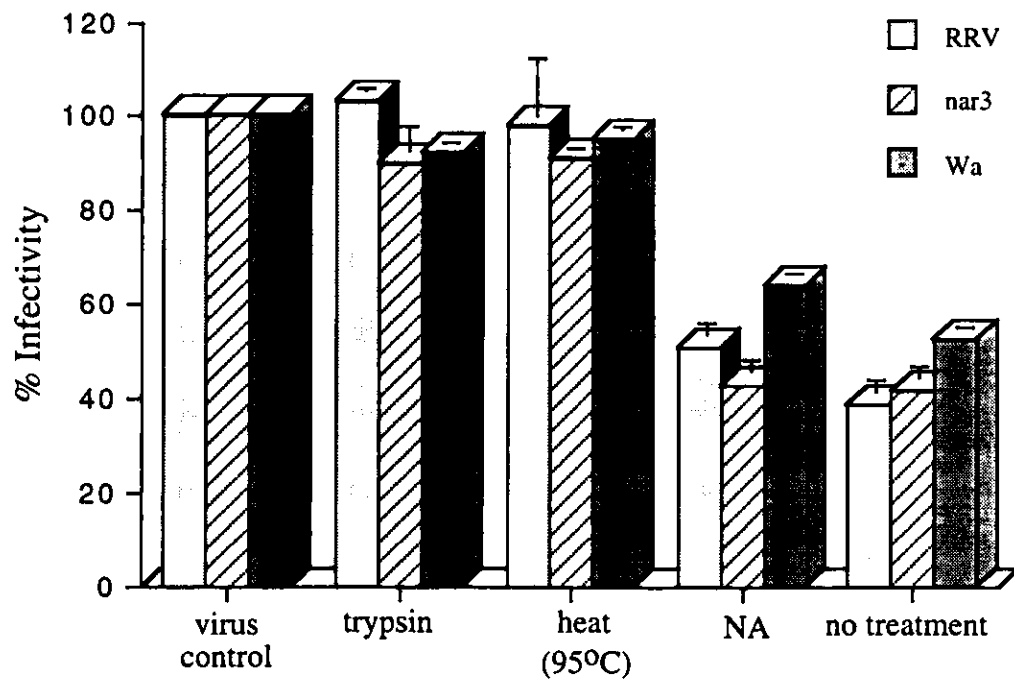


Figure 3

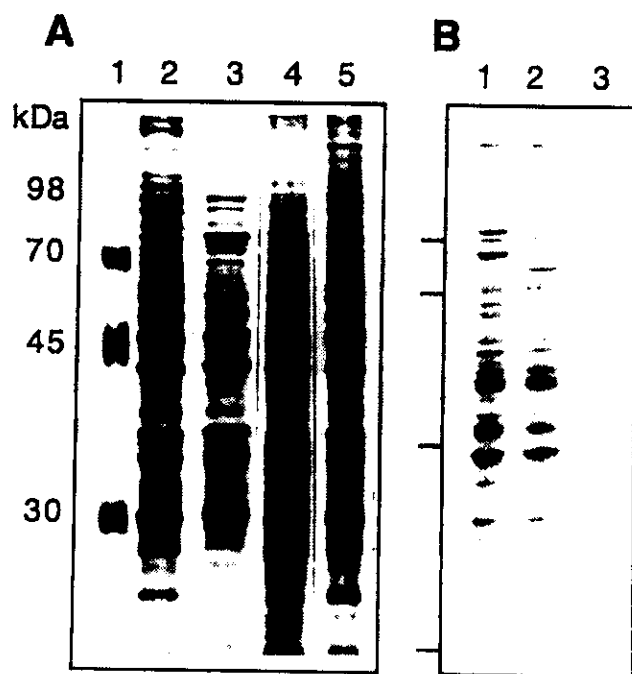


Figure 4

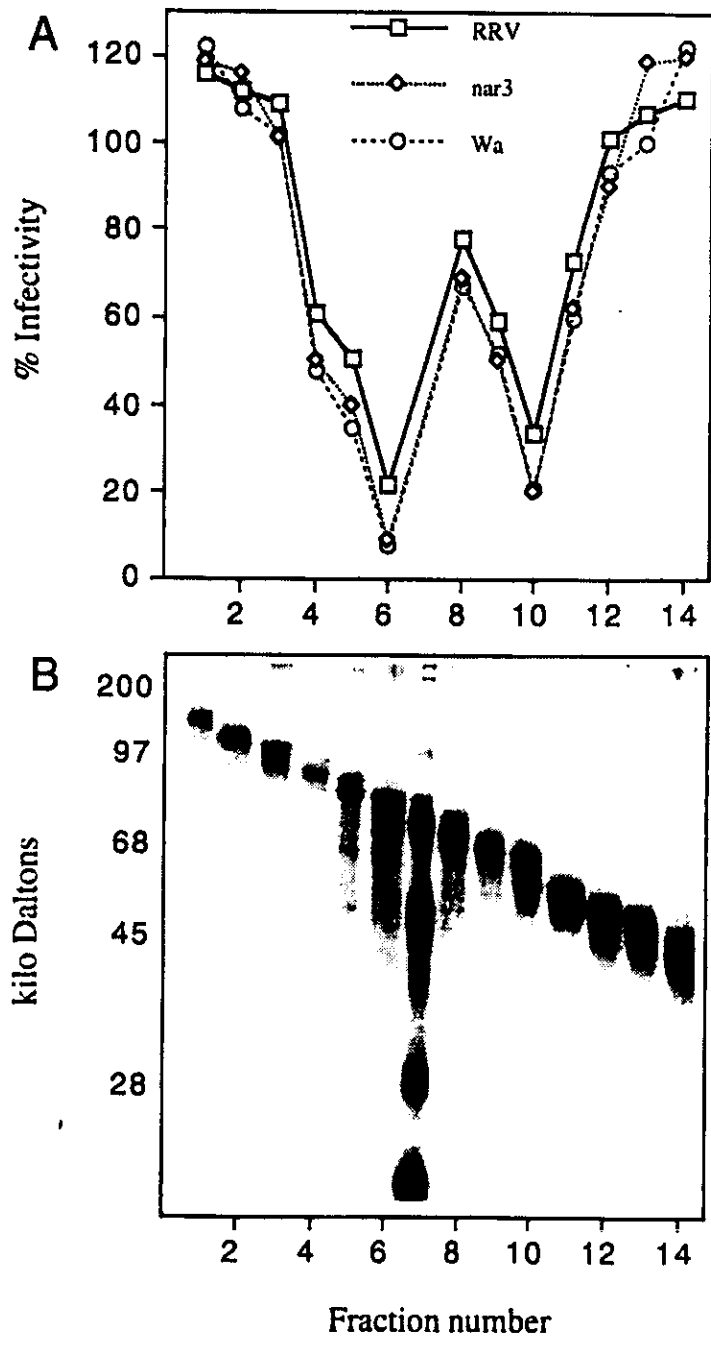


Figure 5

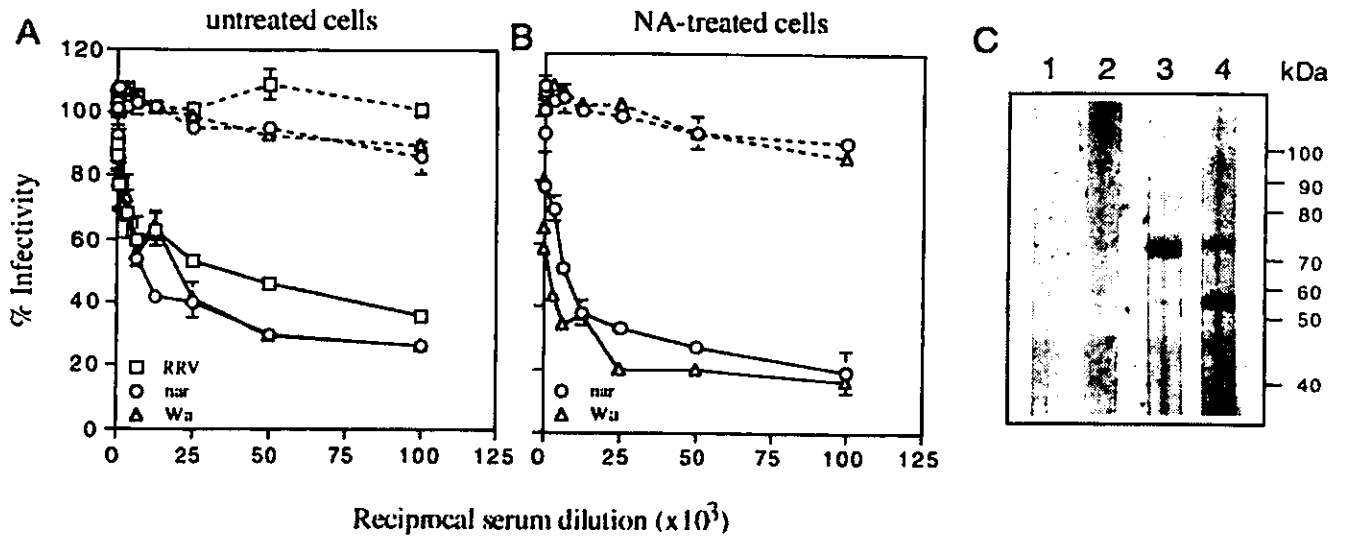


Figure 6

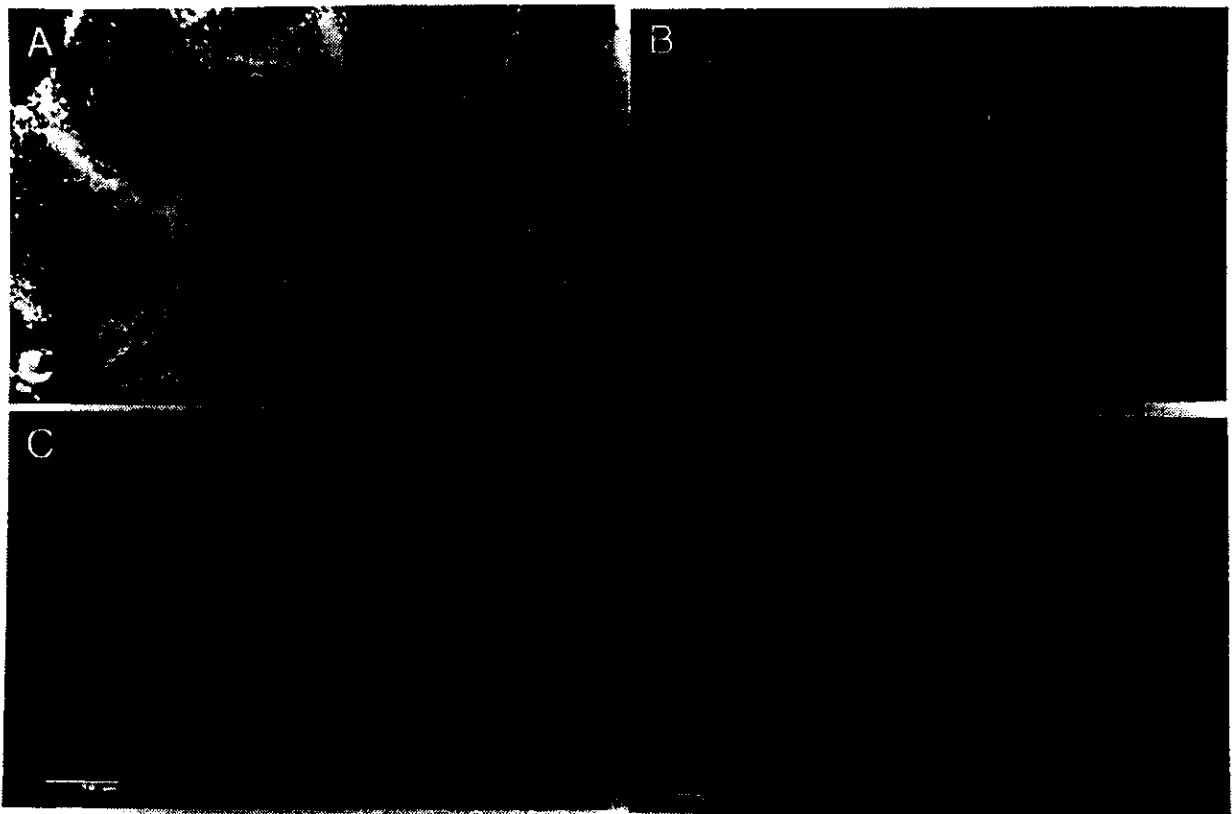


Figure 7

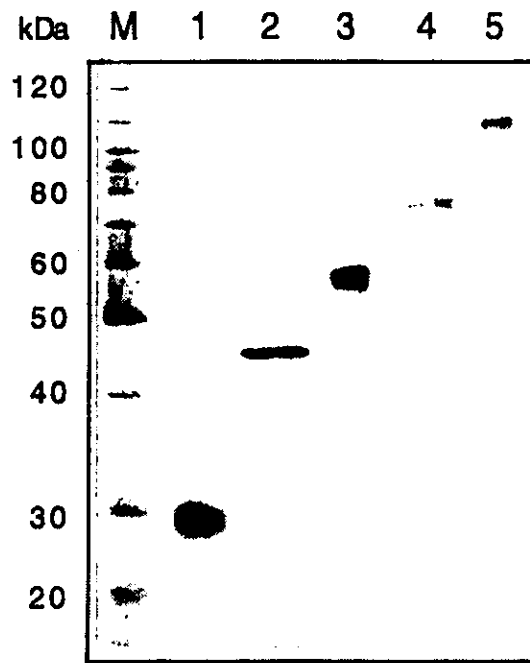


Figure 8

Table 1. Effect of metabolic inhibitors, cell membrane cholesterol depletion, and octyl- β -glucoside on the infectivity of rotaviruses in MA104 cells.

Inhibitor ^a	% infectivity (S.E.) ^b of the indicated virus strain				
	RRV	nar3	Wa	Reovirus	Poliovirus
No treatment	100	100	100	100	100
PDMP (25 μ g/ml)	20 (2)	40 (9.4)	23 (3.8)	95 (3)	114 (0)
Tunicamycin (2 μ g/ml)	56 (2.5)	48 (2.8)	--- ^c	91 (5.5)	192 (15)
BenzylGalNAc (2 mM)	101 (0.5)	150 (4.8)	147 (7.2)	110 (4.5)	108 (4.5)
Octyl- β -glucoside (0.2%)	41 (5.4)	41 (2.4)	39 (4.8)	89 (2)	199 (29)
β -cyclodextrin (1 mM)	9 (1.8)	6 (2.3)	5 (1.8)	96 (0)	95 (3)

^aMA104 cell monolayers were incubated with the indicated concentration of inhibitor for 1 h (β -cyclodextrin), 24 h (tunicamycin), or 72 h (PDMP, and BenzylGalNAc) at 37°C, or for 90 min (octyl- β -glucoside) at room temperature, before virus infection.

^bS.E., one standard error of the mean of at least three independent experiments carried out in duplicate.

^cThe infectivity of Wa was inhibited by about 50 %, regardless if tunicamycin was added to the cells 24 h before, or immediately after the virus adsorption; thus, this inhibition was considered as non-specific.

Table 2. Effect of metabolic inhibitors, cell membrane cholesterol depletion, and octyl- β -glucoside on the binding of rotaviruses to MA104 cells.

Inhibitor ^a	% binding (S.E.) ^b of the indicated virus strain		
	RRV	nar3	Wa
No treatment	100	100	100
PDMP (25 μ g/ml)	110 (19)	46 (20)	104 (12.5)
Tunicamycin (2 μ g/ml)	111 (14)	101 (12.5)	94 (21)
Octyl- β -glucoside (0.2%)	32 (4.5)	40 (7.5)	33 (0.5)
β -cyclodextrin (1 mM)	112 (6.5)	109 (16)	116 (4.5)

^aMA104 cell monolayers were incubated with the indicated concentration of inhibitor for 1 h (β -cyclodextrin), 24 h (tunicamycin), or 72 h (PDMP) at 37°C, or for 90 min (octyl- β -glucoside) at room temperature, before the assay.

^bS.E., one standard error of the mean of at least three independent experiments carried out in duplicate.

Table 3. Effect of the OG extract, and antibodies to 75 kDa OG protein fraction, on the binding of rotaviruses to MA104 cells.

Inhibitor ^a	% binding (S.E.) ^b of the indicated virus strain		
	RRV	nar3	Wa
0.2 % OG (control)	100	100	100
OG extract (20 µg/ml)	60 (2.5)	59 (4)	57 (1.5)
No serum (control)	100	100	100
Polyclonal antibodies to the 75 kDa OG fraction			
----Preimmune serum	102 (10)	97 (8)	105 (5.5)
----Hyperimmune serum	92 (6.5)	68 (2.5)	28 (3.5)

^a Rotaviruses were incubated with the indicated concentration of OG extracted proteins for 90 min at 37°C. The virus-OG extract mixture was then added to MA104 cells in suspension, and the assay performed as described in Material and Methods. The blocking activity of the hyperimmune sera to the 75 kDa protein fractions was assayed by pre-incubating the MA104 cells with a 1:5 dilution of the preimmune or hyperimmune sera for 1 h at 4°C. After washing the cells, the viruses were added, and the assay carried out as described in Material and Methods.

^bS.E., one standard error of the mean of at least three independent experiments carried out in duplicate.

Table 4. Blocking of rotavirus infectivity by purified OG-extracted proteins from MA104 cells

Protein (kDa)	Protein relative amount ^a	% infectivity of the indicated virus ^b		
		RRV	nar3	Wa
110	2	50	51	38
75	1	41	17	29
57	5	62	50	68
45	10	55	23	31
30	15	44	25	23

^aThe amount of each protein incubated with the rotavirus strains is the same as that shown in the gel of Fig. 8. The 75 kDa band was the less abundant, and was considered as 1 (about 10 ng) in relative terms. The concentration of this protein during the infectivity assay was about 100 ng/ml.

^bThe infectivity blocking assay was carried out only once due to the scarce material available.

Integrin $\alpha v \beta 3$ mediates rotavirus cell entry

Carlos A. Guerrero*, Ernesto Méndez, Selene Zárate, Pavel Isa, Susana López,
and Carlos F. Arias†

Departamento de Genética y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62250, Mexico.

*Corresponding author: Carlos F. Arias, Instituto de Biotecnología/UNAM, A.P. 510-3, Colonia Miraval, Cuernavaca, Morelos 62250, Mexico. Tel (52-73) 11-4701; Fax (52-73) 17-2388; e-mail: arias@ibt.unam.mx

†In academic leave from the Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia

Text pages: 22 Figures: 6 Tables: 0
Abstract: 197 words paper: 44,363 characters

Abbreviations: SA, sialic acid; NA, neuraminidase; HRV, human rotavirus; MAb, monoclonal antibody; OG, octyl- β -glucoside; PMA, phorbol 12-myristate-13-acetate.

Abstract

Rotavirus strains differ in their need for sialic acid (SA) to initially bind to the cell surface, however, the existence of a post-attachment cell receptor, common to most, if not all rotavirus strains, has been proposed. Here, we show that antibodies to αv and $\beta 3$ integrin subunits, and the $\alpha v\beta 3$ ligand, vitronectin, efficiently blocked the infectivity of the SA-dependent rhesus rotavirus RRV, its SA-independent variant nar3, and of the naturally neuraminidase-resistant human rotavirus strain Wa. Vitronectin and anti- $\beta 3$ antibodies, however, did not block the binding of the viruses to the cell surface, indicating that rotaviruses interact with $\alpha v\beta 3$ at a post-binding step, probably penetration. This interaction was shown to be independent of the tripeptide motif arginine-glycine-aspartic acid present in the natural ligands of this integrin. Transfection of CHO cells with $\alpha v\beta 3$ genes significantly increased their permissivity to all three rotavirus strains, and the increment of virus infectivity was reverted by incubation of the cells with either antibodies to $\beta 3$ or vitronectin. These findings implicate $\alpha v\beta 3$ integrin as a common cellular receptor for both SA-dependent and -independent rotaviruses, and suggest that this integrin could determine, at least in part, the susceptibility of cells to be infected by rotaviruses.

Introduction

Rotaviruses, the leading cause of severe dehydrating diarrhea in infants and young children worldwide, are non-enveloped viruses that possess a genome of 11 segments of dsRNA contained in a triple-layered protein capsid. The outermost layer is composed of two proteins, VP4 and VP7. VP4 forms spikes that extend from the surface of the virus, and has been associated to a variety of functions, including the initial attachment of the virus to the cell membrane, and the penetration of the virion into the cell (1).

Rotaviruses have a very specific cell tropism, infecting only enterocytes on the tip of intestinal villi (2), what suggests that specific host receptors must exist. In vitro, they also display a strict tropism, binding to a variety of cell lines, but infecting efficiently only those of renal or intestinal epithelium origin (3). Despite the advances in the molecular and structural biology of the virus, little is known about the rotavirus cell receptors. It has been known for sometime that some animal rotavirus strains attach to sialic acid (SA) on the cell surface, and this interaction has been shown to be required for the efficient infection of the virus to susceptible cells both in vitro and in vivo (4). However, the binding of animal rotaviruses to a SA-containing cell receptor has been shown to be non essential, since variants whose infectivity is no longer dependent on the binding to these acid sugars have been isolated (5). The secondary importance of SA as the attachment site for rotaviruses is also reflected by the fact that the infectivity of most, if not all, human rotavirus (HRV) strains, is not affected by neuraminidase (NA)-treatment of cells (6-8).

Integrins are a family of α/β heterodimers of cell adhesion receptors that mediate cell-extracellular matrix and cell-cell interactions, and are known to function as signaling receptors for a variety of cellular effects including spreading, migration, proliferation, differentiation and survival (9-11). These cell molecules are turning out to be commonly used as receptors for many different viruses, including echoviruses 1, 8, 9, and 22 (12-15), coxsackievirus A9 (16), foot-and-mouth disease virus (17, 18), papillomavirus (19), adenovirus (20), adeno-associated virus type 2 (21), and hantaviruses (22), with integrin $\alpha v\beta 3$ being, so far, the most frequently employed as virus receptor (14, 16, 17, 20, 22).

Recently, it was found that rotavirus surface proteins contain sequence binding motifs for integrins $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, and $\alpha x\beta 2$, and antibodies to these integrins, and peptides containing these sequence motifs, were shown to block the infectivity of the simian rotavirus strain SA11, and the HRV strain RV5 (23). In addition, it was shown that integrins $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha 4\beta 1$ can mediate the attachment and entry of rotavirus SA11 into the human myelogenous leukemic cell line K562 (24).

We recently found that the nonionic detergent octyl- β -glucoside (OG) is able to extract proteins from MA104 cells, under noncytolytic conditions, which inhibit the infectivity of rotaviruses when preincubated with the virus before cell infection, and we purified from such an extract several polypeptides that retained the ability to block virus infectivity (25). In this work we identify one of these proteins as the β 3 integrin subunit, and we show that integrin α v β 3 interacts with SA-dependent and -independent strains at a post-attachment step, and is able to promote rotavirus infection of the poorly permissive CHO cells.

Materials and Methods

Cells and Viruses. MA104 cells were cultured in Eagle's minimal essential medium (MEM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS). CHO cells were grown in Dulbecco's modified MEM (DMEM), 10% FCS. CHO cells transfected with integrins α IIb β 3 (CHO-A5), and α v β 3 (CHO-VNRC) (26), were grown in DMEM, 10% FCS, in the presence of 400 μ g/ml of G418 (GIBCO). Rotavirus strains RRV, Wa, and nar3 (5, 8) were propagated in MA104 cells (8). Reovirus serotype 1 was obtained from C. Ramos, Instituto Nacional de Salud Pública. Cuernavaca, Mor., Mexico, and was grown in L929 cells as previously described (27). Poliovirus type 3 was obtained from R.M. del Angel, CINVESTAV, Mexico D.F. and grown in MA104 cells. Rabbit polyclonal antibody against reovirus type 1 was kindly provided by P. Lee. University of Calgary, Alberta, Canada.

Ligands, Peptides, and Antibodies. Laminin, glycophorin A, chondroitin sulphate A, bovine serum albumin (BSA), and collagen type I were obtained from Sigma Chemical Co. Fibronectin was from GIBCO, and vitronectin was either purchased from Sigma or purified from human plasma, as described (28). All proteins were used at 10 μ g/ml, unless otherwise indicated. Peptides GRGDSP, and GRGESP (thereafter called RGD and RGE, respectively) were obtained from GIBCO, and used at 400 μ g/ml. Polyclonal goat IgG antibodies directed to an epitope located at the amino terminus of integrin subunits α 2, α 3, α 4, α v, α x, α IIb, β 2, and β 3, and MAb 4B7R to subunit β 1, were obtained from Santa Cruz Biotechnology, and used at 20 μ g/ml. MAbs to integrins α 1 (FB12), α 2 (P1E6), α 3 (P1B5), α 4 (P1H4), α 5 (P1D6), α 6 (NK1-GoH3), α v (P3G8), α IIb (CA3), α v β 3 (LM609), β 1 (P4G11), β 2 (P4H9), β 3 (25E11), β 4 (ASC-9), purchased from Chemicon, were used at 10 μ g/ml. MAbs to integrins α 2 (P1E6, 3.2 μ g/ml), β 2 (MHM23, 41 μ g/ml), and α 4 (P4G9, 8.1 μ g/ml), were from DAKO, and used at the concentrations indicated. MAb B5-IVF2 to β 5 (Upstatc Biotechnology) was used at 10 μ g/ml. MAb 26 to β 3 (Transduction Laboratories) was used at 5 μ g/ml.

Infectivity Assay. MA104 or CHO cells in 96-well plates were washed twice with MEM, and then about 1000 focus-forming units (ffu's) of rotaviruses RRV, nar3, or Wa, or of control viruses, reovirus and poliovirus, were adsorbed to the cells for 45 min at 4°C (for 1h at 37°C in the

case of CHO cells). After the adsorption period, the virus inoculum was removed, the cells were washed twice with MEM, and the infection was left to proceed for 14 h at 37°C. The infected cells were fixed and detected by an immunoperoxidase focus detection assay, as described previously (29). The ffu's were counted with the help of a Visiolab 1000 station (Biocom, France) (25).

Blocking Assays. To evaluate the blocking activity of integrin ligands and antibodies, and of RGD and RGE peptides, MA104 or CHO cells were washed twice with MEM, and were then incubated with the indicated concentrations of the reagents in MEM, for 60 min (90 min for antibodies) at 37°C. For all incubations with vitronectin, MEM containing 400 μM Mn^{2+} instead of Ca^{2+} was used (30). For all other procedures, including washings, regular MEM with Ca^{2+} was used. After the incubation step, the reagents were removed and the cells were infected as described above. To evaluate if antibodies to $\beta 3$ and vitronectin were able to inhibit rotavirus infectivity if added after the virus had been adsorbed, MA104 cells in 96-well plates were washed twice with MEM, chilled on ice for 5 min, and the virus adsorbed at 4°C for 60 min. The cells were then washed twice with ice-cold MEM, and either vitronectin (1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or anti- $\beta 3$ antibodies (Santa Cruz Technology, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) were added, and incubated for 1 h at 4°C. The cells were washed once with MEM, and the infection was left to proceed for 14 h at 37°C before immunostaining for the virus. As control for these experiments, vitronectin or anti- $\beta 3$ antibodies were added for 1 h at 4°C before addition of the viruses for 1 h at 4°C, or were added to the cells after the virus had been adsorbed for 1 h at 37°C.

Binding Assay. The binding assay was carried out as described by Zárate et al. (31). Briefly, a suspension of 5×10^4 cells, preincubated with either 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of a goat polyclonal antibody to the $\beta 3$ integrin subunit (Santa Cruz Technologies), or with 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of vitronectin for 1 h at 4°C, were mixed with 300 ng of purified virus in MEM-1% BSA in a final volume of 200 μl , and incubated for 1 h at 4°C with gentle mixing. The cell-virus complexes were washed three times with ice cold PBS containing 0.5% BSA. In the last wash, the cells were transferred to a fresh tube, and then treated with 50 μl of lysis buffer (50 mM Tris [pH 7.5], 150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100). The virus present in the lysates was quantified by an enzyme-linked immunoassay (31). In all binding assays, a binding control with no cells was performed.

Results

Antibodies to $\alpha v\beta 3$ integrin inhibit rotavirus infectivity. Several protein bands with the ability to block rotavirus infection were isolated from MA104 cells by extraction with the nonionic detergent octyl- β -glucoside (25). Tryptic peptides from one of these proteins, of apparent molecular weight of 110 kDa, were sequenced; one of them was found to be identical to amino acids 266 to 279 of the human $\beta 3$ integrin subunit, while two other peptides were derived from filamin and spectrin proteins. Given this finding, we tested antibodies to $\beta 3$ for their ability to block the infectivity of the SA-dependent simian rotavirus RRV, its NA-resistant variant nar3, and the naturally NA-resistant HRV strain Wa. A monoclonal antibody (Mab 26) to this integrin inhibited the infectivity of all three rotavirus strains by 40 to 45%, depending on virus strain (Fig. 1A). Since $\beta 3$ is known to associate with integrin subunits αv and αIIb (9), we tested the blocking activity of antibodies to these integrin subunits; a polyclonal antibody to αv , or a MAb (LM609) that recognizes both αv and $\beta 3$ subunits, inhibited the infectivity of rotaviruses (Fig. 1B), while a MAb to subunit αIIb had no effect (not shown).

Since integrins $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, and $\alpha x\beta 2$ have been suggested to play a role during rotavirus infection (25), we compared the blocking activity of antibodies directed to each subunit of these integrins with the activity of antibodies to αv and $\beta 3$ (Fig. 1B). Antibodies to $\alpha 2$, $\alpha 4$, and $\beta 2$ were able to inhibit the infectivity of all three rotavirus strains by 22 to 44%, depending on the antibody, and the virus strain tested, while MAbs to αx and $\beta 1$ had low, or no inhibitory capacity, depending on the virus strain. On the other hand, antibodies to either αv or $\beta 3$ inhibited all strains by 44 to 50%, with exception of nar3, whose infectivity was reduced by 27% by the αv antibody. We also tested antibodies to integrin subunits $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\beta 4$, and $\beta 5$; none of them, including those to αIIb , blocked the infectivity of any of the three viruses by more than 9% (not shown).

The block in infectivity by MAbs to $\alpha 2$ and $\beta 3$ integrins is additive. When antibodies directed to each subunit of a given integrin heterodimer were mixed, no additive inhibition of infectivity was observed (not shown). However, when combination of antibodies directed to

different integrins were tested, antibodies to $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha v\beta 3$ had a clear additive blocking effect (Student's *t* test, $p < 0.001$), suggesting that these integrins are involved in different stages of rotavirus infection. None of the other integrin antibody combinations blocked the infectivity of the viruses additively (Fig. 2).

Inhibition of rotavirus infectivity by integrin ligands. The incubation of cells with various integrin ligands showed that vitronectin, which is known to interact with $\alpha v\beta 3$, blocked rotavirus infectivity by about 60-70 % at 0.5 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 3); fibronectin, which is also an $\alpha v\beta 3$ ligand, inhibited infectivity by 30 to 50% when used at 20 times that concentration; and collagen type I, which binds to $\alpha 2\beta 1$, blocked virus infectivity by about 20% at 10 $\mu\text{g/ml}$. Other integrin ligands and glycoproteins, such as laminin, chondroitin sulphate, glycoporphin A, and BSA had no effect on rotavirus infectivity when incubated with the cell before virus infection (not shown).

Rotaviruses interact with a region of $\alpha v\beta 3$ different from its RGD-binding site.

Typically, $\alpha v\beta 3$ integrin recognizes its ligands through the tripeptide RGD (9), however, neither VP4 nor VP7 proteins, of any of the rotavirus strains tested have this consensus sequence. To evaluate if rotaviruses were interacting with this integrin by an RGD sequence that could be conformed in the tridimensional structure of the viral proteins rather than being continuous, or through a region in the $\alpha v\beta 3$ integrin, different from the RGD-binding site, we evaluated the ability of an RGD peptide to block the viral infectivity. Incubation of the cells with this peptide inhibited by about 20% the infectivity of all three rotavirus strains, as compared to the 70% inhibition caused by vitronectin (Fig. 4). Pre-incubation of the cells with RGD before addition of vitronectin relieved the blocking capacity of this protein, indicating that RGD efficiently blocked the attachment of vitronectin to $\alpha v\beta 3$. A control peptide, RGE, neither blocked rotavirus infectivity, nor relieved the blocking effect of vitronectin. These results indicate that rotaviruses bind to $\alpha v\beta 3$ through a region different from the RGD-binding site, and suggest that vitronectin might be blocking rotavirus infectivity through steric hindrance. The fact that the RGD peptide was able to block at low levels the infectivity of rotavirus suggests that the virus binds to $\alpha v\beta 3$ through a site close to the RGD-recognition domain.

Rotaviruses interact with $\alpha v\beta 3$ at a post-attachment step. To find out if the interaction of rotaviruses with $\alpha v\beta 3$ was at the level of attachment or at a post-attachment step, we carried out rotavirus binding inhibition experiments with vitronectin and antibodies to $\beta 3$. Vitronectin was found not to inhibit the binding of any of the rotavirus strains tested, while antibodies to the $\beta 3$ subunit blocked the binding of the viruses only slightly (Fig. 5A). These results suggest that $\alpha v\beta 3$ is not used by rotaviruses for their initial attachment to the cell surface. In agreement with this observation is the fact that if vitronectin or the anti- $\beta 3$ antibody are added to the cells after the viruses had been adsorbed at 4°C, they still inhibit their infectivity (Fig. 5B). Of interest, the effect of the antibody, when added after adsorption of the virus, was more pronounced than when added before the virus. On the other hand, if the virus was adsorbed for 60 min at 37°C (temperature that allows the internalization of the virus into the cell), before vitronectin or the anti- $\beta 3$ antibody are added, no inhibitory effect was observed (not shown).

Recombinant $\beta 3$ integrin promotes rotavirus infection of CHO cells. To test if expression of $\beta 3$ integrin could facilitate the infectivity of rotaviruses into the poorly permissive CHO cells, we tested the infectivity of all three rotavirus strains in CHO cells and in the stably transfected CHO variant cells VNRC and A5, which express the $\alpha v\beta 3$ and $\alpha IIb\beta 3$ integrins, respectively (26). We found that both $\beta 3$ -expressing cells were three to four times more susceptible to rotavirus infection than the parental CHO cells, and this increase in infectivity was shown to be blocked by incubation with either an antibody to $\beta 3$, or vitronectin (shown in Fig. 6 for VNRC cells), indicating that the augmented infectivity observed in these cells is due to the expression of $\beta 3$ integrin.

Discussion

To understand the early events of rotavirus infection we have undertaken the comparative characterization of three rotavirus strains: the SA-dependent simian rotavirus RRV, its NA-resistant variant nar3, and the HRV strain Wa, which is naturally resistant to NA-treatment of cells. Through competition infection assays with these three viruses we have described the existence of at least three cell surface sites involved in the interaction of rotaviruses with MA104 cells during the early steps of infection (8). In this work we have identified integrin $\alpha v\beta 3$ as a post-binding receptor for rotavirus in these cells.

The binding of rotaviruses to $\alpha v\beta 3$ was shown to be RGD-independent, consistent with the fact that neither of the surface proteins, VP4 and VP7, nor the protein that forms the intermediate layer of the virus, VP6, have an RGD sequence motif. It remains to be determined which of the viral proteins is responsible for interacting with this integrin. The cellular entry of hantaviruses has also been shown to be mediated by $\beta 3$ integrins (22), and similar to rotaviruses, their entry was not blocked by RGD peptides, and was still mediated by $\alpha IIb\beta 3$ -integrin mutants defective in ligand binding, indicating that their interaction with $\beta 3$ is independent of the integrin binding to physiologic ligands. The binding of $\alpha v\beta 3$ to sequences other than RGD is not without precedent, since such an interaction has been reported for other proteins, including matrix metalloproteinase 2, basic fibroblast growth factor, and ADAM 23/MDC3 human disintegrin (32).

We have reported that rotavirus nar3 binds to MA104 cells through the VP5 domain of VP4 (31), and more recently we have found that this attachment is mediated by integrin $\alpha 2\beta 1$ (Zárate et al., manuscript in preparation). We have also found that RRV interacts with this integrin after initially binding to a SA-containing compound, through the VP8 domain of VP4. The role of $\alpha 2\beta 1$ in the infection of rotavirus Wa is still not clear, but it seems to be used by the virus in a second interaction after attaching to a so far unknown receptor (Zárate et al., unpublished observations). The fact that antibodies to $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha v\beta 3$ blocked rotavirus infection in an additive manner suggests that these integrins play a role at different stages of virus entry, and this observation is consistent with the idea that regardless of the cell molecule recognized in the first instance by these three rotavirus strains, they all engage in a post-attachment interaction with integrin $\alpha v\beta 3$. In this context, it is of interest that rotaviruses bind to essentially every cell line that has been tested, however, they only infect efficiently cells of intestinal or renal origin (3). Thus, the interaction with $\alpha v\beta 3$ could be responsible, at least in part, of the restricted cell range of these viruses.

By flow cytometry, integrin $\alpha v\beta 3$ has been found in MA104, COS7, and Caco-2 cells (not shown, and ref 33), which are all susceptible to rotavirus infection. On the other hand, this integrin was not detected, or was barely detected, in CHO, BHK, and K562 cells (not shown, and ref 34), which are about 100- to 1000-fold less susceptible to infection by these viruses. Thus, there seems to be a correlation between the susceptibility to rotavirus infection and the presence of integrin $\alpha v\beta 3$; however, analysis of a larger panel of permissive and semi-permissive cells is needed to confirm this observation.

Rotavirus infection was initially reported to be mediated by integrins by Coulson's group (23, 24). They showed that the binding of rotavirus SA11 to the human myelogenous leukemic cell line K562 was increased by expressing integrins $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha 4\beta 1$ via transfection (24), and this increased binding was shown to lead to an augmentation in the productive infection of the transfected cell lines. It was also shown that treatment of K562 cells with the phorbol ester phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) significantly increased the infection of cells, without increasing the level of virus binding, and it was concluded that the induction of the endogenous $\alpha 2\beta 1$ gene expression was the most likely basis for the augmented infectivity. It is known, however, that in addition to the induction of $\alpha 2\beta 1$, PMA also induces high expression levels of integrin $\alpha v\beta 3$ in K562 cells (34). The fact that Hewish et al. did not detect an enhancement in the binding of SA11 virus to PMA-treated cells, suggests that the increase in infectivity observed was the result of a post-binding interaction. Thus, it is likely that at least a fraction of the increased infectivity observed in PMA-treated K562 cells could have been contributed by the induced expression of $\alpha v\beta 3$. Since CHO cells do not express $\alpha 2\beta 1$ on their surface (unpublished observation), the enhancement of rotavirus infectivity observed in the $\beta 3$ -expressing cells VNRC and A5 is likely to be due only to the enhanced expression of this integrin.

Integrin subunit $\beta 3$, as well as integrin $\alpha 2\beta 1$, have been reported to be present in murine and human enterocytes, mostly associated to the basolateral surface of cells (35-37). Thus, if these integrins are involved in facilitating rotavirus cell entry in a natural infection, they might be initially available for virus interaction in limited amounts, unless the regions of cell-cell contact are disrupted to expose their basolateral surface. In this regard, it is of interest a recent report where rotaviruses were shown to induce structural and functional alterations in tight junctions of polarized intestinal Caco-2 cell monolayers (38). In this context, it is also of interest that the enteroviruses coxsackievirus A9 and echovirus 9 can employ integrin $\alpha v\beta 3$ as cellular receptor (14, 16), and that

adenovirus-mediated gene delivery to the intestinal epithelium is dependent, or significantly increased, by the presence of $\alpha v\beta 3$, among other integrins (33, 36).

The requirement for several cell molecules, which may be needed to be present and organized in a defined manner, might explain the exquisite cell and tissue tropism of these viruses. This idea is consistent with the fact that although expression of integrins $\alpha v\beta 3$ in CHO cells (this work) or $\alpha 2\beta 1$ in K562 cells (24) enhances the susceptibility of these cells to rotavirus infection, the level of permissivity achieved does not really approach that of MA104 cells, suggesting that other cellular molecules important for rotavirus entry are missing. It remains to be established which, if any, of the receptor molecules described so far is indeed non replaceable, and if in fact there exists a unique pathway of infectivity for rotaviruses, with distinct entry points for different strains.

Acknowledgments

We are grateful to Rafaela Espinosa and Pedro Romero for their excellent technical assistance, and to the computer staff, specially to Alma Martínez Valle, for their technical support. This work was partially supported by grants 75197-527106 from the Howard Hughes Medical Institute, G0012-N9607 from the National Council for Science and Technology-Mexico, and IN201399 from DGAPA-UNAM.

Figure Legends

Fig. 1. Rotavirus infectivity is inhibited by antibodies to $\alpha v\beta 3$ integrin. Antibodies to $\beta 3$ integrin (A) or to different integrin subunits (B) were added to monolayers of MA104 cells for 90 min at 37°C. After incubation with antibody, the cells were washed twice with MEM, and then RRV, nar3, or Wa viruses were adsorbed for 45 min at 4°C, the viral inoculum was removed, and the infection was left to proceed for 14 h at 37°C. At this time, the cells were fixed and immunostained, as described under Materials and Methods. Data are expressed as percentage of the virus infectivity obtained when the cells were preincubated with MEM as control. The bars represent the standard error of at least three independent experiments performed in duplicate. In (B), the dotted lines at 80% and 100% infectivity are shown for reference. The antibody used in panel A was MAb26. The antibodies used in panel B were: polyclonal goat antibodies to $\alpha 4$, αx , αv , and $\beta 3$ (20 $\mu\text{g/ml}$); MAb 4B7R to $\beta 1$ (20 $\mu\text{g/ml}$); MAb LM609 to $\alpha v\beta 3$ (10 $\mu\text{g/ml}$); and MAbs PIE6 (3.2 $\mu\text{g/ml}$) and MHM23 (41 $\mu\text{g/ml}$) to $\alpha 2$ and $\beta 2$, respectively.

Fig. 2. Antibodies to $\alpha v\beta 3$ and $\alpha 2\beta 1$ integrins inhibit rotavirus infectivity additively. Combinations of antibodies directed to different integrins were tested for their ability to block the infectivity of rotaviruses, as described in the legend for Fig. 1. Data are expressed as percentage of the virus infectivity obtained when the cells were preincubated with MEM as control. The bars represent the standard error of at least three independent experiments performed in duplicate. The dotted lines at 80% and 100% infectivity are shown for reference. The antibodies used were the same described in the legend for Fig. 1, except for MAb LM609, which was not employed.

Fig. 3. Inhibition of rotavirus infectivity by integrin ligands. MA104 cells were incubated with either vitronectin (0.5 $\mu\text{g/ml}$), fibronectin (10 $\mu\text{g/ml}$) or collagen type I (10 $\mu\text{g/ml}$) for 60 min at 37°C, washed, and infected with rotaviruses as described in the legend for Fig. 1. Data are expressed as percentage of the virus infectivity obtained when the cells were preincubated with MEM as control. The bars represent the standard error of at least three independent experiments performed in duplicate.

Fig. 4. Rotaviruses attach to a site in $\alpha v\beta 3$ different from the integrin RGD-recognition domain. MA104 cells were incubated with either MEM, or peptides GRGDSP (RGD) or GRGESP (RGE) (400 $\mu\text{g/ml}$) for 60 min at 37°C. The cells were washed, and then vitronectin (Vn, 1.5 $\mu\text{g/ml}$) was

subsequently added to control (MEM) or peptide-incubated cells for 60 min at 37°C. After this time, the cells were washed and infected with rotaviruses as described in the legend for Fig. 1. Data are expressed as percentage of the virus infectivity obtained when the cells were preincubated with MEM as control. The bars represent the standard error of at least two independent experiments performed in duplicate.

Fig. 5. Rotaviruses interact with $\alpha v\beta 3$ at a post-attachment step. (A) MA104 cells in suspension were incubated with a goat polyclonal antibody (20 $\mu\text{g/ml}$) to $\beta 3$ integrin, or with vitronectin (Vn, 1.5 $\mu\text{g/ml}$) for 1 h at 4°C, the cells were washed once with PBS, and subsequently mixed with purified RRV, nar3, or Wa rotaviruses for 1 h at 4°C. After washing, the cells were lysed, and the attached viruses were quantitated by an enzyme-linked assay (31). (B) MA104 cells in 96-well plates were incubated with rotaviruses for 1h at 4°C, and then either $\beta 3$ antibodies or vitronectin (at the same concentrations used in panel A), were added for 1h at 4°C (1st virus/2nd Ab or Vn). In the control experiment (1st Ab or Vn /2nd virus), vitronectin and antibodies were added before the viruses, using the same incubation conditions. The cells were then further incubated for 14h at 37°C, and immunostained for the virus as described under Material and Methods. Data are expressed as percentage of the virus binding, or infectivity, when the cells were preincubated with MEM as control. The bars represent the standard error of at least two independent experiments performed in duplicate.

Fig. 6. Recombinant $\beta 3$ integrin promotes CHO cell infection. Parental CHO cells (CHO) or CHO cells stably transfected with the αv and $\beta 3$ integrin subunit genes (VNRC) (26) in 96-well plates were infected with rotaviruses, as described under Material and Methods. VNRC cells were also infected after they had been preincubated with either vitronectin (1.5 $\mu\text{g/ml}$) (VNRC+Vn) or $\beta 3$ goat polyclonal antibodies (20 $\mu\text{g/ml}$) (VNRC+ $\beta 3$ Ab). Data are expressed as percentage of the virus infectivity obtained when the cells were preincubated with MEM as control. The bars represent the standard error of at least four independent experiments performed in duplicate. The same increase in infectivity observed for VNRC cells, as compared to parental CHO cells, was also observed in CHO cells transfected with the αIIb and $\beta 3$ integrin subunit genes (CHO-A5 cells, not shown).

References

1. Estes, M. K. (1996) in *Virology*, eds. Fields, B. N., Knipe, D. N., Howley, P. M., Chanock, R. M., Melnick, J. L., Monath, T. P., Roizman, B. & Straus, S. E. (Raven Press, New York). Vol. 2, pp. 1625-1655.
2. Kapikian, A. Z. & Chanock, R. M. (1996) in *Virology*, eds. Fields, B. N., Knipe, D. N., Howley, P. M., Chanock, R. M., Melnick, J. L., Monath, T. P., Roizman, B. & Straus, S. E. (Raven Press, New York), Vol. 2, pp. 1657-1708.
3. Estes, M. K. & Cohen, J. (1989) *Microbiol Rev* **53**, 410-449.
4. Ludert, J. E., Feng, N., Yu, J. H., Broome, R. L., Hoshino, Y. & Greenberg, H. B. (1996) *J Virol* **70**, 487-493.
5. Méndez, E., Arias, C. F. & López, S. (1993) *J Virol* **67**, 5253-5259.
6. Ciarlet, M. & Estes, M. K. (1999) *J Gen Virol* **80**, 943-948.
7. Fukudome, K., Yoshie, O. & Konno, T. (1989) *Virology* **172**, 196-205.
8. Méndez, E., Lopez, S., Cuadras, M. A., Romero, P. & Arias, C. F. (1999) *Virology* **263**, 450-459.
9. Hynes, R. O. (1992) *Cell* **69**, 11-25.
10. Juliano, R. L. & Haskill, S. (1993) *J. Cell Biol.* **120**, 577-585.
11. Ruoslahti, E. & Reed, J. C. (1994) *Cell* **777**, 477-478.
12. Bergelson, J. M., Shepley, M. P., Chan, B. M. C., Hemler, M. E. & Finberg, R. W. (1992) *Science* **255**, 1718-1720.
13. Bergelson, J. M., St. John, N., Kawaguchi, S., Chan, M., Stubdal, H., Modlin, J. & Finberg, R. W. (1993) *J. Virol.* **67**, 6847-6852.
14. Nelsen-Salz, B., Eggers, H. J. & Zimmermann, H. (1999) *J. Gen. Virol.* **80**, 2311-2313.
15. Pulli, T., Koivunen, E. & Hyypia, T. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 21176-21180.
16. Roivainen, M., Piirainen, L., Hovi, T., Virtanen, I., Riikonen, T., Heino, J. & Hyypia, T. (1994) *Virology* **203**, 357-365.
17. Jackson, T., Sharma, A., Ghazaleh, R. A., Blakemore, W. E., Ellard, F. M., Simmons, D. L., Newman, J. W., Stuart, D. I. & King, A. M. (1997) *J. Virol.* **71**, 8357-8361.
18. Jackson, T., Sheppard, D., Denyer, M., Blakemore, W. & King, A. M. (2000) *J. Virol.* **74**, 4949-4956.
19. Evander, M., Frazee, I. H., Payne, E., Qi, Y. M., Hengst, K. & McMillan, N. A. (1997) *J. Virol.* **71**, 2449-2456.
20. Wickham, T. J., Mathias, P., Cheresch, D. A. & Nemerow, G. R. (1993) *Cell* **73**, 309-319.
21. Summerford, C., Bartlett, J. & Samulski, R. J. (1999) *Nature Biotechnol.* **5**, 78-82.

22. Gavrilovskaya, I. N., Shepley, M., Shaw, R., Ginsberg, M. H. & Mackow, E. R. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 7074-7079.
23. Coulson, B. S., Londrigan, S. L. & Lee, D. J. (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 5389-5394.
24. Hewish, M. J., Takada, Y. & Coulson, B. S. (2000) *J. Virol* **74**, 228-236.
25. Guerrero, C. A., Zárate, S., Corkidi, G., López, S. & Arias, C. F. (2000) *J. Virol*. Submitted.
26. Díaz-González, F., Forsyth, J., Steiner, B. & Ginsberg, M. H. (1996) *Mol. Biol. Cell* **7**, 1939-1951.
27. Cuadras, M. A., Arias, C. F. & Lopez, S. (1997) *Journal Of Virology* **71** (12), 9065-9074.
28. Yatohgo, T., Izumi, M., Kashiwagi, H. & Hayashi, M. (1988) *Cell Struct. Funct.* **13**, 281-292.
29. Lizano, M., Lopez, S. & Arias, C. F. (1991) *J Virol* **65**, 1383-1391.
30. Hu, D. D., Barbas, C. F. & Smith, J. W. (1996) *J Biol. Chem.* **271**, 21745-21751.
31. Zarate, S., Espinosa, R., Romero, P., Mendez, E., Arias, C. F. & Lopez, S. (2000) *J. Virol* **74**, 593-599.
32. Cal, S., Freije, J. M., López, J. M., Takada, Y. & López-Otín, C. (2000) *Mol. Biol. Cell.* **11**, 1457-1469.
33. Croyle, M. A., Walter, E., Janich, S., Roessler, B. J. & Amidon, G. L. (1998) *Hum. Gene Ther.* **9**, 561-573.
34. Bruger, S. R., Zutter, M. M., Sturgill-Koszycki, S. & Santoro, S. A. (1992) *Exp. Cell Res.* **202**, 28-35.
35. Beaulieu, J. F. (1992) *J. Cell Sci.* **102**, 427-436.
36. Hamilton, T. E., McClane, S. J., Baldwin, S., Burke, C., Patel, H., Rombeau, J. L. & Raper, S. E. (1997) *J Pediatr Surg* **32**, 1695-1703.
37. Martín-Villa, J. M., Ferre-López, S., López-Suárez, J. C., Corell, A., Pérez-Blas, M. & Arnaiz-Villena, A. (1997) *Tissue Antigens* **50**, 586-592.
38. Obert, G., Pfeiffer, I. & Aervin, A. L. (2000) *J. Virol* **74**, 4645-4651.

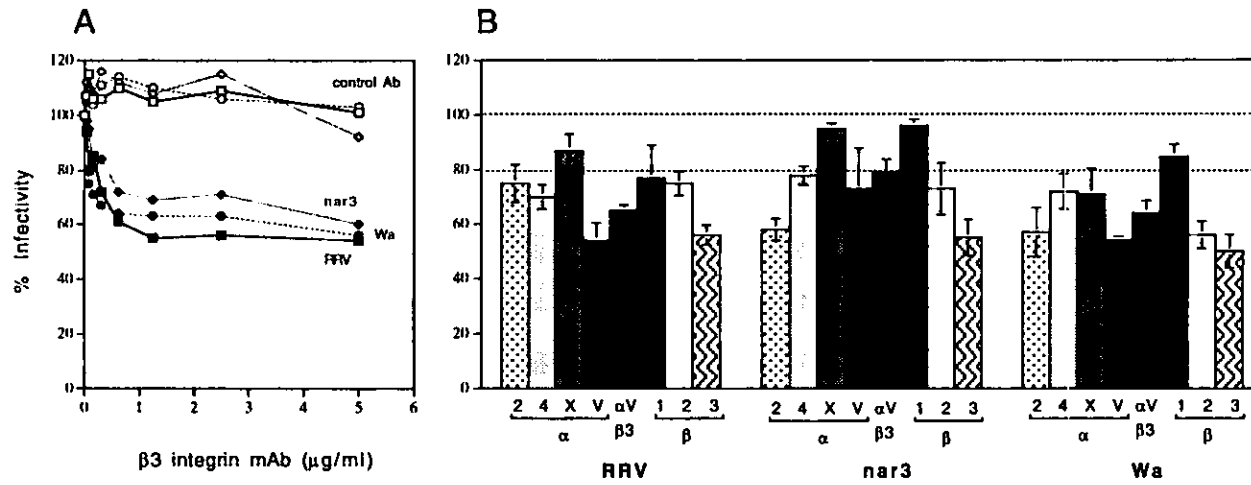


Fig. 1

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

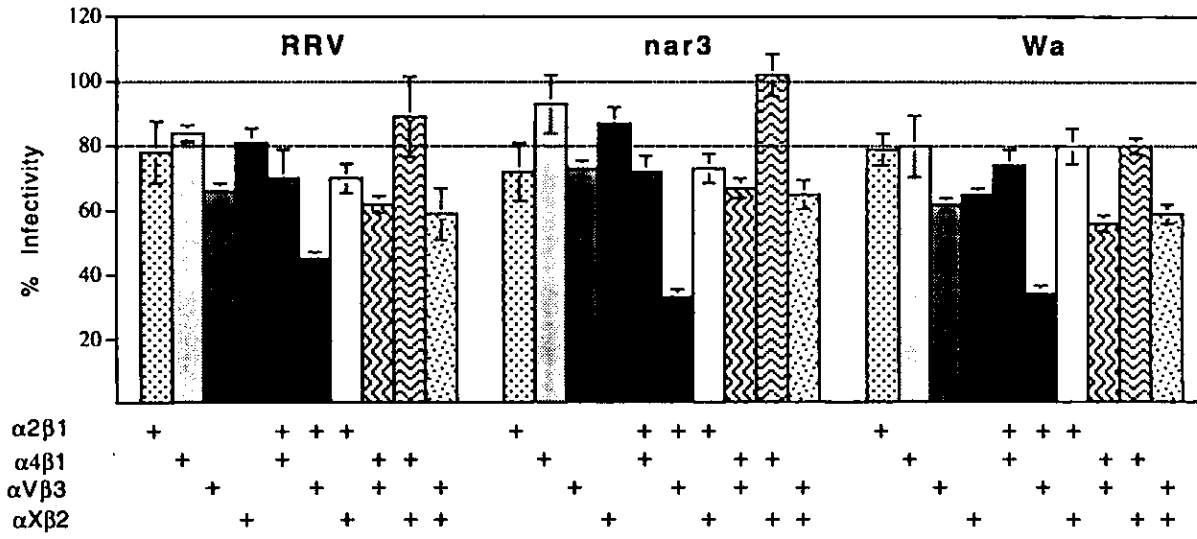


Fig. 2

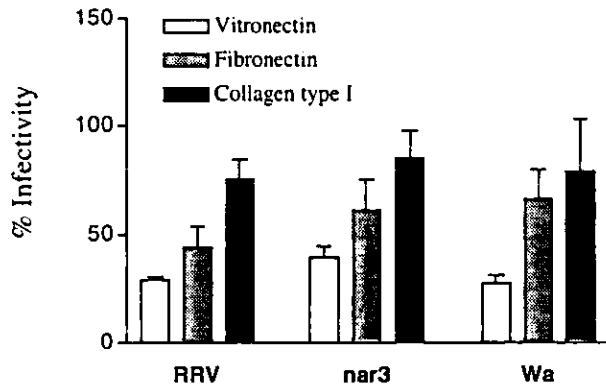


Fig. 3

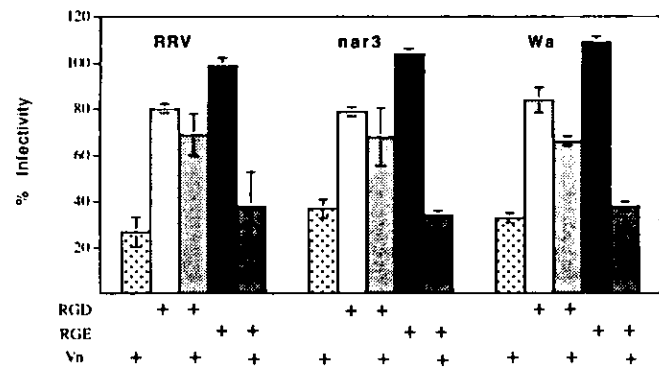


Fig. 4

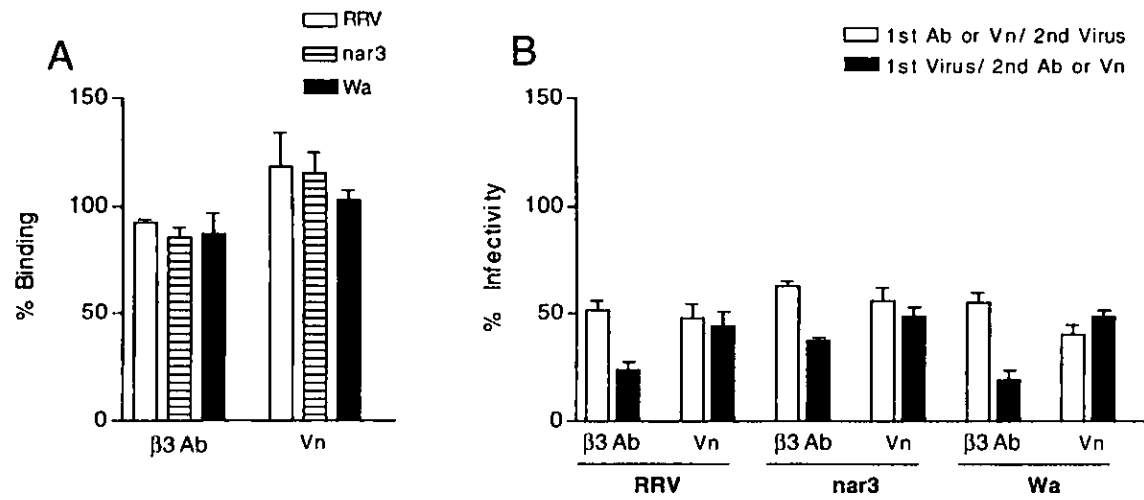


Fig. 5

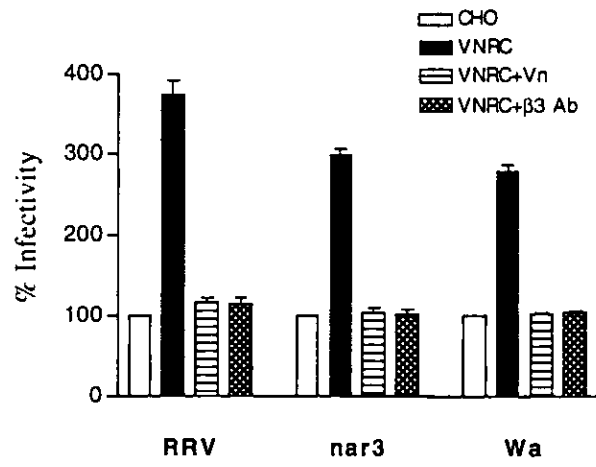


Fig. 6

MATERIALES Y METODOS

(No reportados en los artículos)

Materiales y métodos para determinar que la proteína hsc70 puede ser uno de los receptores para rotavirus.

Anticuerpos. En la técnica de Western blot se usaron los siguientes Acs: Anticuerpos policlonales específico para hsc70 que reconoce 12 amino ácidos (SPA-816, Stressgen) diluido 1:1000 en PBS; y Acs policlonales específico para hsp70 (SPA-812, stressgen), diluido 1:5000.

Los siguientes Acs se utilizaron para bloquear la infección de rotavirus: Acs específicos contra hsc70: el Ac monoclonal MA3-014 (Affinity), se diluyó 1:100. Los Acs monoclonales específicos para hsp70: el Ac SPA-810 (Stressgen) se usó a una concentración de 10 µg/ml y MA3-009 (Affinity) se usó en dilución 1:100. Acs monoclonales que reconocen hsc/hsp70 : MA3-001, MA3-006, MA3-007, MA3-008, (Affinity) se diluyeron 1:100, SPA-822, SPA-820 (Stressgen) y el w27 (Neomarkers) se usaron a una concentración de 10 µg/ml. Igualmente se utilizó un Ac policlonal de conejo inmunizado con la proteína recombinante hsc70 humana, expresada en bacteria; este Ac se purificó con sulfato de amonio (35) y se utilizó a una concentración de 80 µg/ml. También se usó el Ac m específico contra hsp 90, SPA-830 (Stressgen) a una concentración de 10 µg/ml.

Los Acs utilizados como control en el bloqueo de la infección fueron los siguientes: Ac monoclonal contra Vimentina V9 (Zymed), Ac m contra α -tubulina Z022 (Zymed), Ac m contra α -actinina MAB1682 (Chemicon), Ac m contra filamina MAB 1678 (Chemicon) diluidos 1:100. Los Acs policlonales contra el extremo aminoterminal de caveolin-1 (SC-894) y caveolin-2 Sc-1858 (Santa Cruz) se usaron a una concentración de 10 µg/ml.

Proteínas. Para determinar si el virus se une a la proteína hsc70 soluble y si esta interacción bloquea la infectividad viral, se pre-incubaron diferentes concentraciones de proteína hsc70 o de proteínas control, con rotavirus y este complejo se añadió a la célula. Las proteínas hsc70 (SPP-750, Strscsngen) de origen bovino, α -actinina (Sigma), espectrina (Sigma), hsp70 (Sigma) y albúmina (Sigma) se usaron desde 0.83 hasta 830 ng/ml; la hsc70 humana de origen recombinante, producida en bacteria, se usó desde 12.5 hasta 200 ng/ml.

Bloqueos de la infectividad con anticuerpos. Para estudiar la inhibición de la infección con los Acs antes mencionados, se procedió de dos maneras: 1) Los Acs se incubaron con células MA104 en placas de 96 pozos durante 90 minutos a 37°C. Las placas se pre-enfriaron sobre hielo

durante 5 minutos, se eliminó el Ac y se infectaron con aproximadamente 1000 unidades formadoras de focos (uff) con los rotavirus RRV, nar3 o Wa por adsorción durante 45 minutos a 4°C. Los Acs del mismo isotipo se utilizaron como controles negativos. Posteriormente, las placas se lavaron dos veces con MEM sin suero, se añadieron MEM y las placas se incubaron durante 14 horas a 37°C. La infección se detectó por la técnica de inmunoperoxidasa, como focos de infección. Para los ensayos de bloqueo de la infección, en células MA104 y células CaCo, utilizando Acs policlonales contra hsc70 humana recombinante, se procedió de la misma manera y como control se usó el Ac preinmune.

2). Para analizar si los Acs bloquean la infectividad de los rotavirus después que el virus se ha unido a la célula, todo el procedimiento se hizo a 4°C y se procedió de la siguiente manera: las células se pre-enfriaron sobre hielo, la mitad de la placa se incubó con rotavirus, durante 50 minutos, para permitir que éstos se unieran a la célula; posteriormente se lavaron y se incubaron con el Ac, durante 50 minutos (1o virus/2o Ac). Como control, en la otra mitad de la placa se invirtió el procedimiento (1o Ac/2o virus). Las células se lavaron y se continuó con la infección como se describió anteriormente.

Bloqueos de la infectividad con la proteína hsc70. Para analizar si la proteína hsc70 se une al virus y de esta manera bloquea la infección se incubaron en tubos Eppendorff diferentes concentraciones, de la proteína hsc70 o de las proteínas control como α -actinina, espectrina, hsp70 y albúmina, con los rotavirus RRV, nar3 y Wa durante 90 minutos a 37°C, en medio MEM. Como control, se incubó con sólo MEM. Para la infección, las placas de 96 pozos con células MA104 se lavaron dos veces con MEM sin SFB, se preenfriaron sobre hielo durante 5 minutos y se añadió la mezcla de virus-proteína a las células durante 45 minutos a 4°C. Posteriormente se removió el inóculo, las células se lavaron una vez con MEM, se añadió MEM y se incubaron durante 14 horas a 37°C. Las células infectadas se detectaron por la técnica de inmunoperoxidasa. Como control de la especificidad se incubó la proteína hsc70 con reovirus y poliovirus de manera similar a lo descrito para rotavirus

Para analizar a que nivel estaba el efecto inhibitorio de la proteína hsc70, si estaba en la unión o en un paso posterior, se realizó el siguiente ensayo: células MA104 confluentes, crecidas en placas de 96 pozos, se lavaron dos veces con MEM, se pre-enfriaron sobre hielo durante 5 minutos y se incubaron con aproximadamente 1000 unidades formadoras de focos (uff) con los rotavirus RRV, nar3 o Wa por adsorción durante 45 minutos a 4°C. Después, las células se lavaron dos veces con MEM frío y se añadió hsc70 o hsp70, como proteína control, a una concentración de 0.83 hasta

13.28 µg/ml, en MEM por 30 minutos a 4°C, con agitación ocasional. Las placas se incubaron durante 14 horas a 37°C y la infección se detectó por la técnica de inmunoperoxidasa. Como control, las células se infectaron con los rotavirus durante 60 minutos a 37°C, se lavaron con MEM, se adicionó proteína hsc70 y se dejaron durante 14 horas a 37°C.

Ensayo de unión. El ensayo de unión de los rotavirus a la célula MA104 se hizo utilizando la técnica descrita por Zarate (86). Brevemente, 5×10^4 células MA104 en suspensión se preincubaron con Acs dirigidos contra Hsc70 por una hora a 4°C. Después de lavar las células con PBS, se incubaron con 300 ng de virus purificado, manteniendo las células en 1% de albúmina sérica bovina (ASB) en MEM durante una hora a 4°C. El complejo virus-célula se lavó tres veces con PBS -ASB 0.5% frío. Durante el último lavado las células se transfirieron a un nuevo tubo de eppendorf y éstas se lisaron en 50 mM de Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100. El virus presente en el lisado se cuantificó por la técnica de ELISA. En todos los casos se realizó un control de unión sin células. Para conocer si la proteína hsc70 bloquea la infectividad impidiendo la unión de los rotavirus, se pre-incubó la proteína hsc70 con los rotavirus durante 90 minutos a 37°C y el complejo hsc70-rotavirus se añadió a las células MA104 por una hora a 4°C. Después de lavar las células, se procedió en la misma forma a la descrita para los Acs contra hsc70. Para conocer si la hsc70 es capaz de desprender los rotavirus una vez que éstos se unieron a las células, se incubaron con los rotavirus a 4°C durante 60 minutos. Después de lavar las células con PBS, se incubaron con 13.28 µg/ml de proteína hsc70 durante 30 minutos. Posteriormente se lavaron y se continuó como lo descrito para los Acs contra hsc70.

Biotinilación de proteínas de superficie celular. Las monocapas de células MA104 se lavaron dos veces con PBS a temperatura ambiente y se incubaron en obscuridad con 1 mg/ml de immunoPure NHS-SS-Biotin (sulfosuccinimidyl 2-(Biotinamido) ethyl- 1-3 Dithiopropionate) (Pierce) por 30 minutos a 4°C. Posteriormente las células se lavaron y se incubaron en PBS con 0.1 M de glicina por 30 minutos a 4°C. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron con PBS que contenía 0.537mM de EDTA y se incubaron durante 30 minutos a 37°C para desprenderlas. Las células se contaron y se centrifugaron a $85 \times g$ por 5 minutos a 4°C. Se incubaron 22 a 25×10^6 de células con 1 ml de medio MEM que contiene el detergente β-octil-glucósido 0.2% (OG 0.2%) durante 90 minutos a temperatura ambiente con agitación suave, para solubilizar moléculas de la membrana citoplasmática. Después, las células se centrifugaron y se recuperó el extracto OG

0.2%. Se incubaron 100 µl del extracto OG con 5 µl de Ac específico contra hsc70 (SPA-816, Stressgen) durante 1 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. Se añadió Sepharosa-proteína A y se incubó 30 minutos en agitación constante. Como control se incubó el extracto OG con un Ac del mismo isotipo contra una proteína irrelevante. Se hizo un lavado con PBS-albúmina al 1% y tres con PBS solo. El inmunoprecipitado se separó por SDS-PAGE al 11% junto con un extracto OG 0.2% no biotinilado. El gel se transfirió a papel de nitrocelulosa y se analizó por Western Blot usando avidina-peroxidasa para el extracto inmuno-precipitado y el Ac contra hsc70 (SPA-816, Stressgen) para incubarlo con la porción del extracto OG 0.2% no biotinilado. El Ac SPA-816 se reveló añadiendo proteína-A conjugada con peroxidasa. La peroxidasa se reveló usando como sustrato 3-amino-9etil-carbazol (Sigma)

Inmunofluorescencia. Las células MA104 se crecieron en cubreobjetos hasta obtener aproximadamente 80% de confluencia. Las células se lavaron dos veces con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4% a 37°C durante 20 minutos. Se lavaron tres veces en PBS con agitación y se permeabilizaron, o no, incubándolas con PBS-0.5% de Triton X-100 por cinco minutos a temperatura ambiente, se lavaron dos veces con PBS en agitación suave. Las células fijadas se bloquearon con glicina IM una hora a 37°C. Se lavaron dos veces en PBS con agitación y se incubaron con el ac m MA3-014, específico para hsc70 diluido 1:50, durante 90 minutos a 37°C. Las células se lavaron cuatro veces con PBS en agitación y se incubaron con el Ac anti-ratón acoplado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (DAKO Co.) diluido 1:100 en PBS durante una hora a 4°C, en obscuridad. Las células se lavaron 4 veces y se colocaron sobre portaobjetos con 10% de glicerol en PBS. Las láminas se analizaron al microscopio confocal (Bio-Rad MRC-600 y con el apoyo del programa software CoMOS MPL-1000). Todos los planos analizados en el microscopio confocal tenían 0.54 µm de grosor. Como control negativo se usó un Ac m del mismo isotipo.

Citometría de flujo. Las células MA104 se crecieron en monocapa, se lavaron dos veces con 0.537mM de EDTA en PBS a temperatura ambiente y se desprendieron incubándolas 30 minutos a 37°C. Se centrifugaron las células y se incubaron en medio MEM sin suero bovino fetal por lo menos una hora a 4°C. Se resuspendieron las células (2.5×10^5) en PBS con 2% de suero bovino fetal y 0.02% de azida de sodio (solución de lavado). El primer Ac se incubó una hora a 4°C y luego las células se lavaron dos veces con 4 ml de la solución de lavado. El segundo Ac anti-ratón diluido 14 µg/ml (Biosource) acoplado con isotiocianato de fluoresceína, en la solución de lavado.

se incubó una hora a 4°C, en la oscuridad. Las células se lavaron dos veces y se resuspendieron en 50 µl de la solución de lavado, se fijaron con 50 µl de 2% de paraformaldehído en PBS y se analizaron en el fluorocitómetro (Bekton-Dickinson).

Choque térmico. Las células MA104 confluentes (crecidas en monocapa en placas de 96 pozos mantenidas en MEM con suero fetal bovino al 10%) se sometieron a choque térmico durante 20 minutos a 47°C. Se removió el medio de cultivo cuidadosamente y las células se incubaron con los rotavirus RRV, nar3 y Wa (aproximadamente 500 unidades formadoras de focos (uff)) por adsorción durante 60 minutos a 37°C y se continuó el procedimiento que se describió anteriormente.

Western blot. Para evaluar si los dos sueros hiperinmunes contra las dos fracciones de proteína obtenidas por electroforesis preparativa del extracto β -octil-glucósido 0.2% (artículo anexo "Biochemical characterization of rotavirus receptors in MA104 cells"), reconocen la proteína hsc70, 2 µg de proteína hsc70 de origen bovino (SPP-750 Stressgen) o la hsc70 humana recombinante, expresada en bacteria, se resuspendió en un buffer de disociación no reductor, con una concentración final de Tris-HCl 0.0625 M, pH 6.8; SDS 2% p/v; glicerol 10% v/v y azul de bromofenol 0.025%. La muestra se cargó en un gel de poliacrilamida al 11% sin 2 β -mercaptoetanol y sin hervirse. La hsc70 se analizó por Western Blot, usando los sueros hiperinmunes contra las fracciones de 57 y 75 kDa del extracto OG 0.2%. El suero contra la fracción de 75 kDa se usó a una dilución de 1:1000 y el Ac contra la fracción de 57 kDa se usó 1:500 en PBS. Como controles se usaron los Acs pre-inmunes y el Ac específico contra hsc70 (SPA-816 Stressgen) en dilución 1:1000 en PBS. Los Acs se revelaron con proteína-A conjugada con peroxidasa, utilizando como sustrato 3-amino-9etil-carbazol (Sigma)

Aislamiento de proteínas en la fracción insoluble del detergente Tritón X100, denominados microdominios lipídicos o "rafts". Las células MA104 se lavaron dos veces con PBS que contiene 0.537mM de EDTA a temperatura ambiente y se incubaron durante 30 minutos a 37 °C para desprenderlas. Todos los siguientes pasos se hicieron a 4 °C. Se lisaron 10×10^6 células en 500 µl de buffer (50mM de Tris-Cl, pH 7.5, 150mM de NaCl, 2mM de EDTA, 2mM de DTT) con 1% de Tritón X100 durante 30 minutos. Posteriormente, el lisado se llevó a 40% de sacarosa, adicionando 500 ul de sacarosa al 80%, preparada en el buffer descrito. Sobre 1ml del lisado se hizo un gradiente lineal de sacarosa (5% - 30%) utilizando el mismo buffer sin Tritón X100. El gradiente se centrifugó durante 15 - 22 hr a 200.000 x g en un rotor SW41 (Beckman). Las fracciones se colectaron de la parte inferior del tubo hasta la superior por aspiración, utilizando una bomba peristáltica. Cada fracción colectada se precipitó con 5 volúmenes

de acetona y se analizaron mediante la técnica de Western blot utilizando Acs contra la hsc70. Como control, se hizo el mismo procedimiento a células previamente tratadas con ciclodextrina, para retirar el colesterol de la membrana citoplasmática o a células lisadas con el detergente octil glucósido al 0.8%, en lugar del 1% de Tritón X100, para solubilizar los microdominios lipídicos.

RESULTADOS ADICIONALES

LA PROTEINA HSC70 PUEDE SER UNO DE LOS RECEPTORES PARA ROTAVIRUS.

La proteína hsc70 está en la superficie de la membrana citoplasmática.

La Hsc70 es una proteína ubicua que se localiza comunmente en el núcleo y en el citoplasma de la célula. Sin embargo, esta proteína también se ha encontrado en la membrana citoplasmática de varias líneas celulares, así como en células infectadas con virus, en células de la espermatogénesis y en células normales después de un choque térmico (6, 10, 39, 58, 64, 66).

Para tratar de entender si la proteína hsc70 está implicada en el proceso de entrada de los rotavirus a la célula, era importante determinar si ésta proteína está en la superficie celular. Para ésto, utilizamos Ac monoclonales detectando a la proteína por tres técnicas: biotilación de proteínas de superficie de membrana, citometría de flujo y epifluorescencia.

Se biotilaron las proteínas de la superficie celular y se inmunoprecipitaron del extracto de OG 0.2% utilizando un Ac m contra hsc70. El extracto OG 0.2% no biotilado, revelado con un Ac m contra hsc70, permitió ubicar la proteína hsc70 biotilada, revelada con avidina peroxidasa (Fig. 1).

Por citometría de flujo, utilizando dos Ac m contra hsc70 se observó incremento de la señal de fluorescencia, con respecto al Ac m control, del mismo isotipo, sugiriendo que la proteína hsc70 se encuentra en la superficie de las células (Fig. 1).

Igualmente, en la inmunofluorescencia de células no permeabilizadas, utilizando el Ac m. contra hsc70, se observó un patrón irregular en la superficie celular pero con mayor intensidad de la fluorescencia en las uniones intercelulares (Fig. 1). En las células permeabilizadas, se encontró una señal débil principalmente en el núcleo (no mostrado). No se detectó señal fluorescente con Acs control utilizados en las células permeabilizadas y no permeabilizadas.

En base a este hallazgo concluimos que la proteína hsc70 está en la superficie de las células MA104 (Fig. 1), aunque se desconoce cómo puede llegar a la membrana citoplasmática ya que no tiene secuencia señal para exportación ni para transporte a retículo endoplásmico o Golgi.

Anticuerpos contra la proteína hsc70 inhiben la entrada de los rotavirus.

Para analizar la capacidad que tienen los Acs específicos contra la proteína hsc70 de bloquear la infectividad de los rotavirus, se pre-incubaron con las células. Igualmente, se utilizaron Acs específicos contra hsp70, hsc/hsp o policlonales generados con hsc70 recombinante humana, expresada en bacterias. La incubación fue durante 90 minutos a 37 °C antes de adicionar el virus. Encontramos que los Acs específicos contra hsc70 bloquean la infectividad de los rotavirus RRV, nar3 y Wa, mientras que los Ac monoclonales contra hsp70, que se usaron como control, no

mostraron efecto inhibitorio. Los Ac monoclonales que reconocen hsc/hsp bloquearon aproximadamente el 60% para RRV y Wa y 50% para nar3 (Fig. 2A). Estos Acs monoclonales, que reconocen hsc/hsp, tuvieron un efecto aditivo cuando se mezclaron, inhibiendo la infectividad en aproximadamente 80% (Fig. 2B). El Ac monoclonal específico contra hsc70 bloqueó 30% la infectividad de RRV y 40% la de nar3 y Wa. Los Acs policlonales inhibieron la infectividad de los tres virus en un 65% en células MA104 y CaCo-2 (Fig. 3), mientras que el suero preinmune no bloqueó la infección. Los Acs contra hsc70 no bloquearon la unión de los virus a la célula, independientemente del orden en que se agregaron el virus y los Acs a éstas, lo que sugiere que el bloqueo de la infectividad ocurrió en un paso posterior a la adsorción (Fig. 4).

El hecho de que los Acs contra hsc70 sólo bloqueen la infectividad de los rotavirus y no la de otros virus como polio y reovirus, indica que el efecto de estos Acs es específico. Los rotavirus tampoco fueron bloqueados por Acs dirigidos contra otras proteínas no relacionadas como α -actinina, vimentina, tubulina, espectrina o filamina (Fig. 2A y datos no mostrados).

Observamos que mezclar los Acs contra las integrinas α_x , β_2 , β_3 y la hsc70, éstos tienen un efecto aditivo en bloquear la infección de los rotavirus, tanto cuando se añaden antes de unir el virus, como cuando se añade después de unir el virus a la célula, alcanzando el bloqueo al 99% en este último caso (Fig. 5).

Por otro lado, el suero hiperinmune generado contra la fracción de 75 kDa, descrito en el artículo "Biochemical characterization of rotavirus receptors in MA104 cells", reconoce la hsc70 humana recombinante, expresada en bacterias, en un ensayo de western blot cuando la muestra se analiza por electroforesis en condiciones no desnaturizantes (Fig. 6). En estas mismas condiciones, el suero contra la fracción de 57 kDa no reconoció la hsc70 (datos no mostrados).

La proteína hsc70 soluble inhibe la entrada de los rotavirus a la célula.

Para estudiar si la proteína hsc70 soluble bloquea la infectividad viral, se incubaron diferentes concentraciones de esta proteína con rotavirus antes de agregarlos a la célula para evaluar su infectividad. La proteína hsc70 de origen bovino y la hsc70 recombinante humano, producida en bacteria, bloquearon en 50% la infectividad de las tres cepas de rotavirus (Fig. 7A). En contraste, la infectividad de poliovirus y reovirus no se vió afectada cuando estos virus se incubaron con la proteína hsc70 (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que la proteína hsc70 se une a los rotavirus de manera específica, quizá compitiendo con la proteína hsc70 presente en la superficie de la célula, reduciendo así la infección.

Para determinar si la proteína hsc70 inhibía la infección a través de bloquear la unión del virus a la célula o en un paso posterior, se hicieron dos tipos de ensayos: en el primero la proteína hsc70 se preincubó con los rotavirus y luego este complejo se adicionó a las células, manteniendo la temperatura a 4 °C. En este ensayo, solamente inhibió la unión de Wa en 30% y no se inhibió la

unión de RRV y nar3 (Fig. 7B). En el otro ensayo de unión, el virus se añadió a la célula y posteriormente se añadió la proteína hsc70 (Fig. 8B). En este tipo de ensayo, la hsc70 no desplazó la unión de ninguno de los tres virus, sugiriendo que la proteína hsc70 interactúa con el virus, después de que el virus se ha unido a otras moléculas celulares.

Estos resultados concuerdan con los ensayos de infectividad, en los que observamos que la proteína hsc70 es capaz de bloquear más de 90% la infectividad de los rotavirus, cuando se añade a la célula después que el virus se ha unido a 4 °C (Fig. 8). Esto apoya la idea que la interacción del virus con la proteína hsc70 tiene lugar en un paso posterior a la unión inicial del virus con la célula. Así mismo, la proteína hsc70 no inhibió la infección cuando se agregó al cultivo 60 minutos después de que el virus había sido incubado con la célula a 37 °C, tiempo al cual el virus penetró e inició la infección en las células .

Aún no sabemos si la hsc70 reconoce algunas regiones hidrofóbicas de VP4 o de VP7, las dos proteínas de la capa externa del virus, o de VP6, la proteína de la capa intermedia. Sin embargo, en resultados preliminares utilizando la técnica de ELISA encontramos que la hsc70 reconoce de manera específica a la partícula viral que carece de las dos proteínas de la capa externa, que se conoce como partícula de doble capa "DLP", donde la proteína expuesta es VP6.

Para conocer si el efecto de hsc70 es específico o también está implicada su homóloga la proteína inducible hsp70, se incubó la proteína soluble hsp70 con los rotavirus o se añadió la proteína hsp70 después de unir el rotavirus a la célula (Fig.8). Los resultados indican que la actividad de hsc70 en la entrada de los rotavirus a la célula es específica pues la proteína soluble hsp70 no bloqueó la infección.

El choque térmico a las células MA104 aumenta la infectividad de los rotavirus.

Al someter las células MA104 crecidas en placas de 96 pozos, mantenidas en MEM con suero fetal bovino al 10%, a choque térmico se aumentó la infectividad de los rotavirus RRV, nar3 y Wa de 3 a 4 veces con respecto a las células que no fueron sometidas al choque térmico (Fig. 9). El aumento de la infectividad probablemente se debe a un aumento de la expresión de la hsc70 en la superficie celular ya que se correlaciona con el aumento en la expresión de la proteína hsc70, en la membrana citoplásmica, observado mediante la técnica de citometría de flujo y al hecho de que el aumento de la infectividad disminuye cuando se bloquea con Acs contra la hsc70 (Fig 9).

La proteína hsc70 se encuentra en microdominios lipídicos o "rafts"

Los datos de este trabajo sugieren que la integrina $\beta 3$ y la hsc70 están en los microdominios lipídicos de baja densidad ("rafts") (Fig. 10). La ubicación de estas proteínas parece ser específica debido ya que éstas proteínas no se encontraron en los "rafts" cuando se hizo el mismo procedimiento a células previamente tratadas con ciclodextrina, para retirar el colesterol

de la membrana citoplasmática o a células lisadas con el detergente octil glucósido al 0.8%, en lugar del 1% de Tritón X100, para solubilizar los microdominios lipídicos (Fig 10).

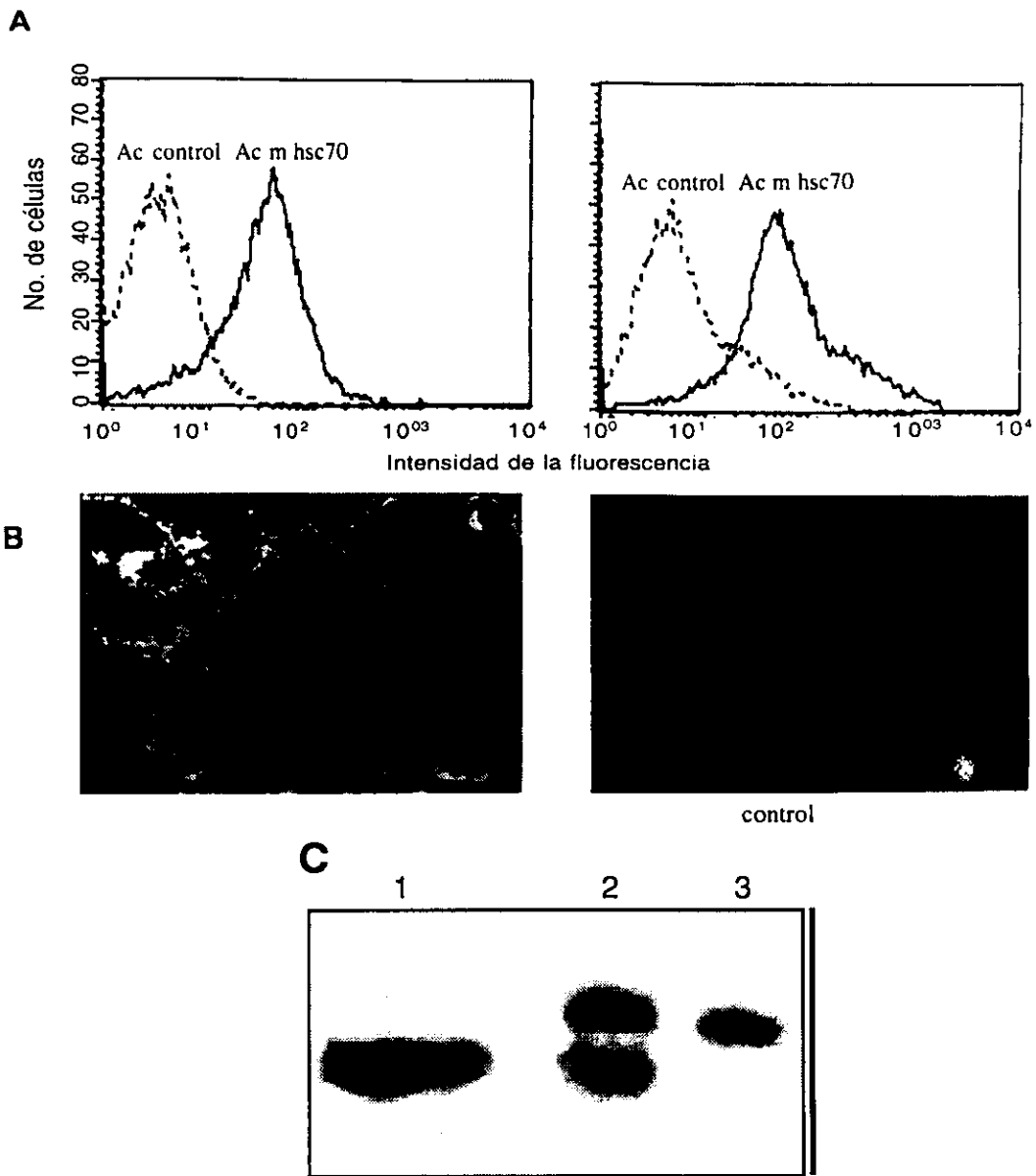


Figura 1. La proteína hsc70 está en la superficie de la membrana de células MA104. (A). Citometría de flujo. Se utilizaron dos AcSM contra hsc70, un IgG contra el péptido 122-264 y un IgM. (B). Inmunofluorescencia. Se utilizó un AcM contra hsc70, en células no permeabilizadas, como control se utilizó un AcM del mismo isotipo (C). Biotinilación de proteínas de la superficie celular. 1. Extracto OG no biotinilado, como primer Ac se usó un AcM contra hsc70 y se reveló con proteína A-peroxidasa . 2. Inmunoprecipitación de las proteínas biotiniladas utilizando un AcM contra hsc70 y reveladas con avidina peroxidasa. 3. Control de la inmunoprecipitación, utilizando un AcM del mismo isotipo, contra una proteína irrelevante. Las células fueron tratadas según se describe en materiales y métodos

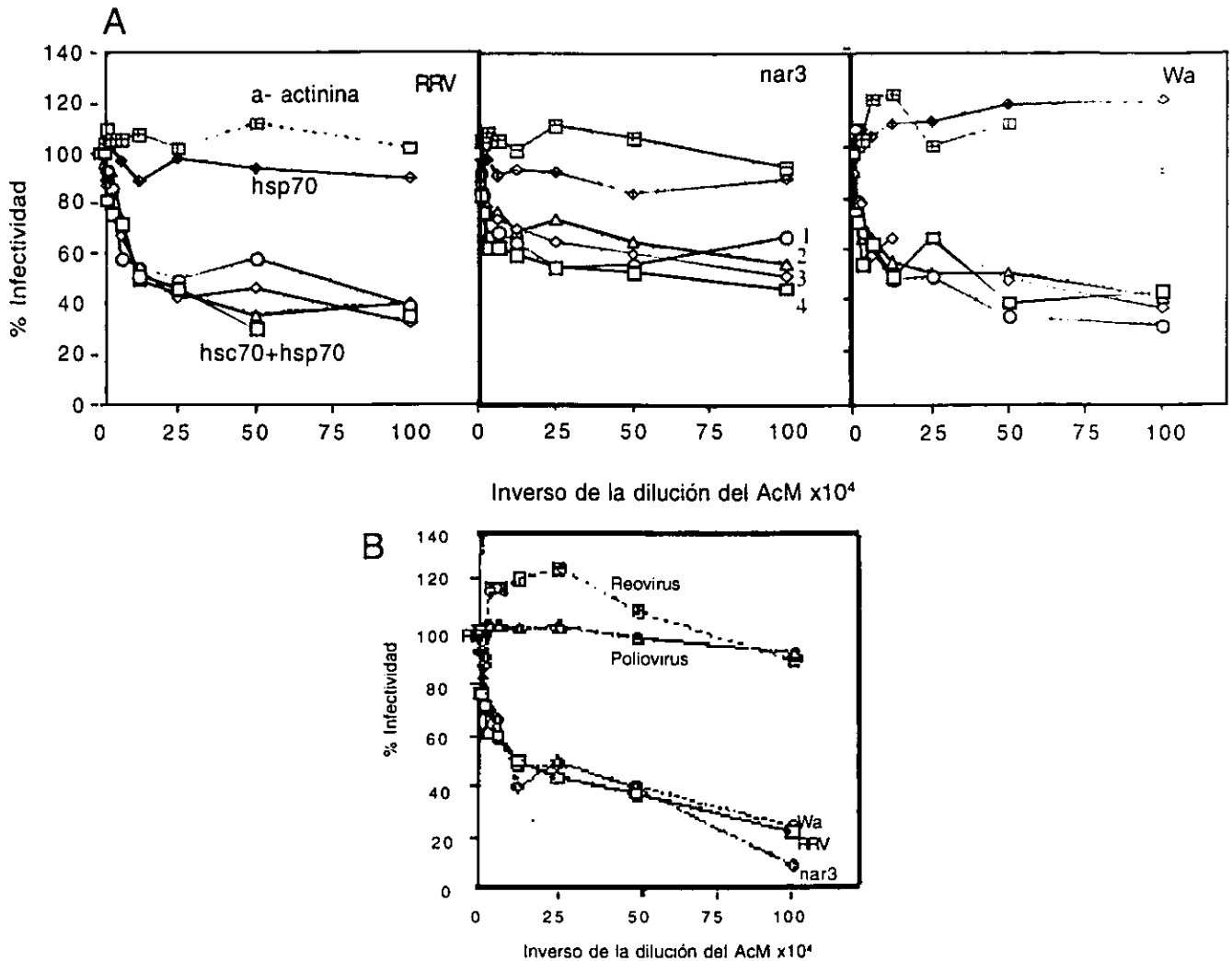


Figura.2. Anticuerpos contra la proteína hsc70 inhiben la entrada de los rotavirus. Células MA104 se incubaron con los Acs en placas de 96 pozos durante 90 minutos a 37 °C. Las placas se pre-enfriaron sobre hielo durante 5 minutos, se eliminó el Ac y se infectaron con los rotavirus RRV, nar3 o Wa por adsorción durante 45 minutos a 4 °C. Acs contra las proteínas actinina y hsp70 se utilizaron como control. Las placas se lavaron, se adicionó MEM y se incubaron durante 14 horas a 37°C. (A). Se utilizaron 4 AcM contra dominios diferentes de hsp70/hsc70. Cada Ac reconoce la región entre los aminoácidos: 1). 122-264. 2) y 3). 473-479 4). 504-617 de hsp70/hsc70 (B). Los 4 AcM fueron mezclados. Como control un Ac M contra hsp70 y contra a-actina.

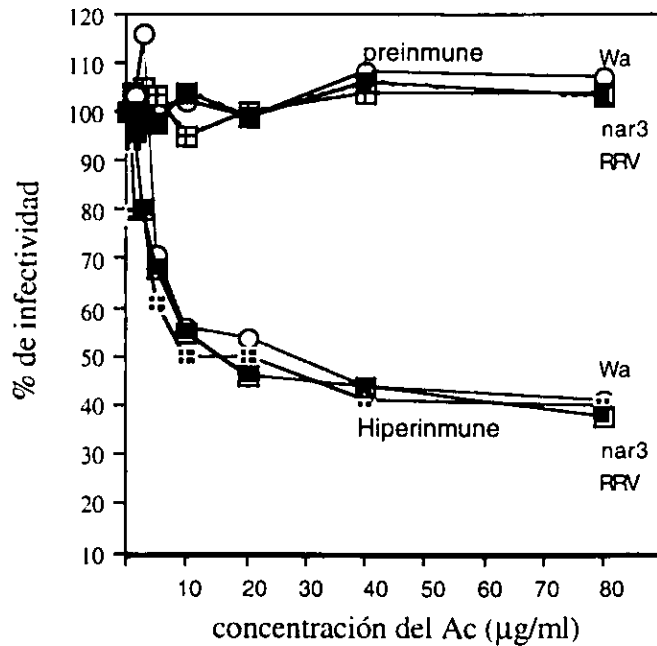


Figura.3. Anticuerpos policlonales contra la proteína hsc70 humana, expresada en bacterias, inhiben la entrada de los rotavirus en células CaCo. Se incubaron 80 µg/ml de Acs con las células en placas de 96 pozos durante 90 minutos a 37 °C. Las placas se enfriaron sobre hielo durante 5 minutos, se eliminó el Ac y se infectaron con los rotavirus RRV, nar3 o Wa por adsorción durante 45 minutos a 4 °C. Los Ac preinmunes se utilizaron como control. Las placas se lavaron, se adicionó MEM y se incubaron durante 14 horas a 37°C.

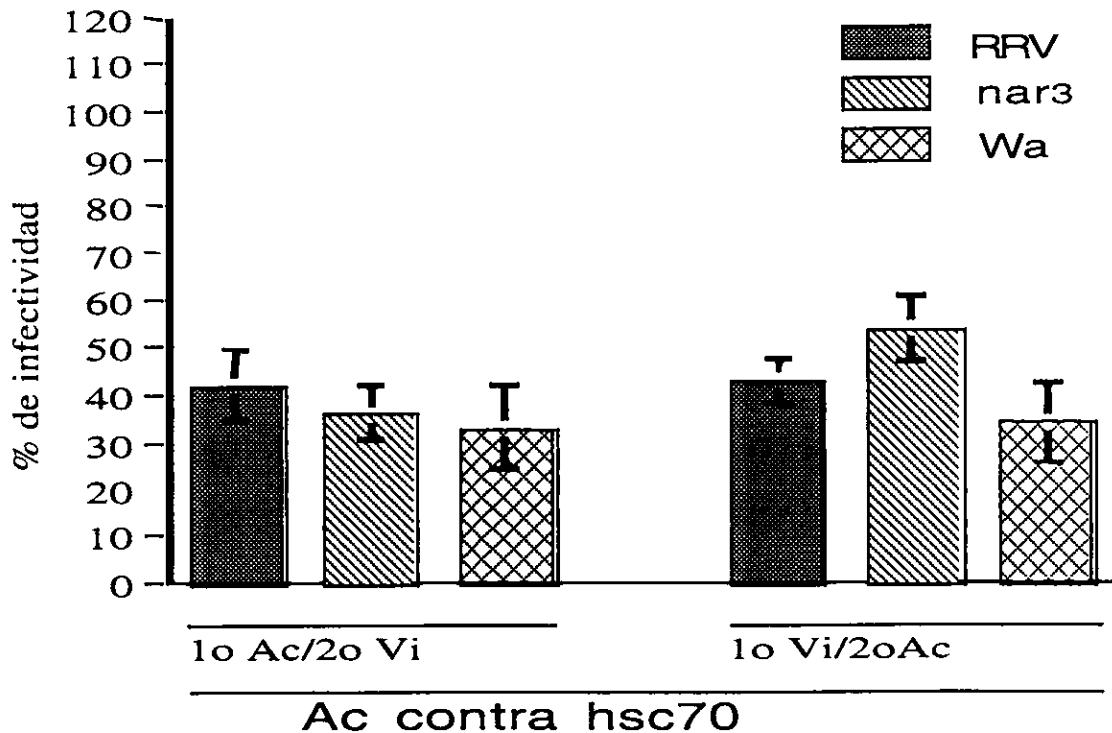


Figura. 4 .El efecto inhibitorio de los Acs contra hsc70 ocurre después de unirse el virus a la célula. La mitad de la placa se incubó primero con rotavirus durante 50 minutos, para permitir que éstos se unieran a la célula, se lavaron y segundo se incubaron con el Ac durante 50 minutos (1o virus/2o Ac). Como control, en la otra mitad de la placa se invirtió el procedimiento (1o Ac/2o virus). Las células se lavaron y se continuó con la infección como se describe en materiales y métodos. Se utilizaron Acs policlonales contra hsc70 a una concentración de 80 µg/ml . Las barras representan el error estandar de al menos tres experimentos realizados por duplicado.

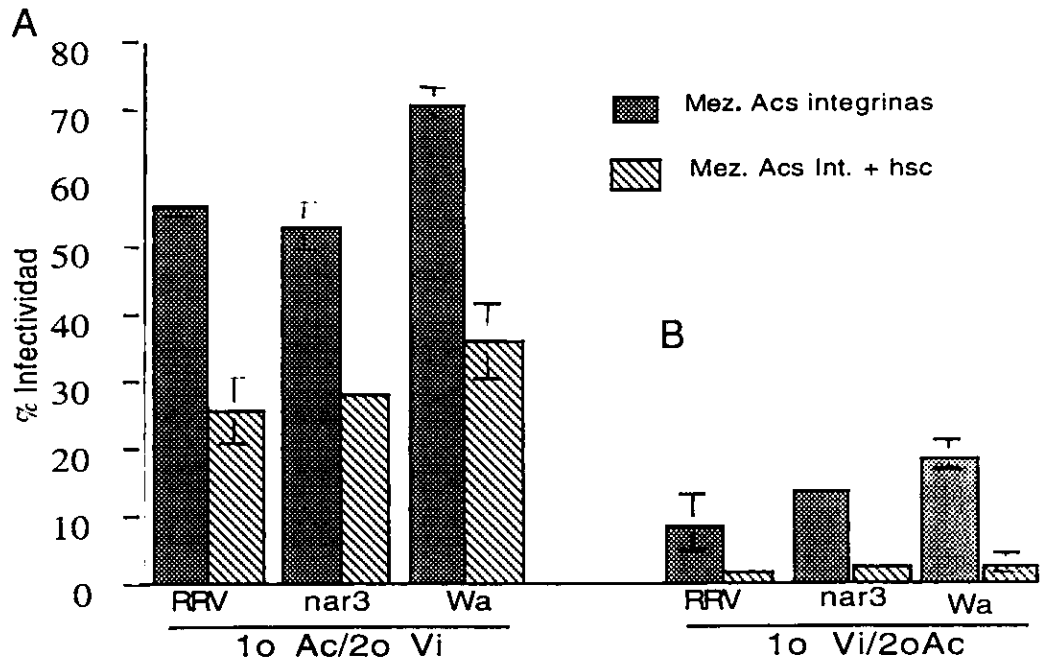


Figura. 5 Acs contra las integrinas α , β 2, β 3 y la proteína hsc70, bloquean el 99% la infectividad de los rotavirus, cuando se incuban después de unir el virus a la célula. Todo el procedimiento se hizo a 4 °C. La mitad de la placa se incubó primero con rotavirus durante 50 minutos, para permitir que éstos se unieran a la célula, se lavaron y segundo se incubaron con el Ac durante 50 minutos (1o virus/2o Ac). Como control, en la otra mitad de la placa se invirtió el procedimiento (1o Ac/2o virus). Las células se lavaron y se continuó con la infección como se describe en materiales y métodos. Se mezclaron 20 μ g/ml de Acs policlonales contra la integrinas α , β 3 y β 2 o a la mezcla de Acs contra las integrinas se añadió 80 μ g/ml de Acs policlonales contra la proteína hsc70. (A). Primero Ac/Segundo virus (B). Primero virus/Segundo Ac. Las barras representan el error estandar de al menos tres experimentos, realizados por duplicado.

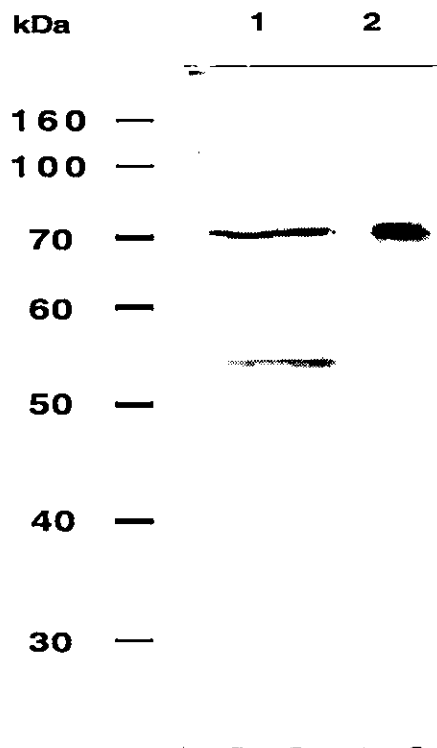


Figura 6. El suero hiperinmune contra la fracción de 75 kDa, descrito en el artículo anexo "Biochemical characterization of rotavirus receptors in MA104 cells", reconoce la hsc70 humana recombinante, expresada en bacterias. La muestra se separó por electroforesis en condiciones no reductoras, junto con el extracto OG y se detectó en un ensayo de Western blot utilizando el suero hiperinmune. 1. Extracto de OG. 2. Proteína hsc70 (2 μ g).

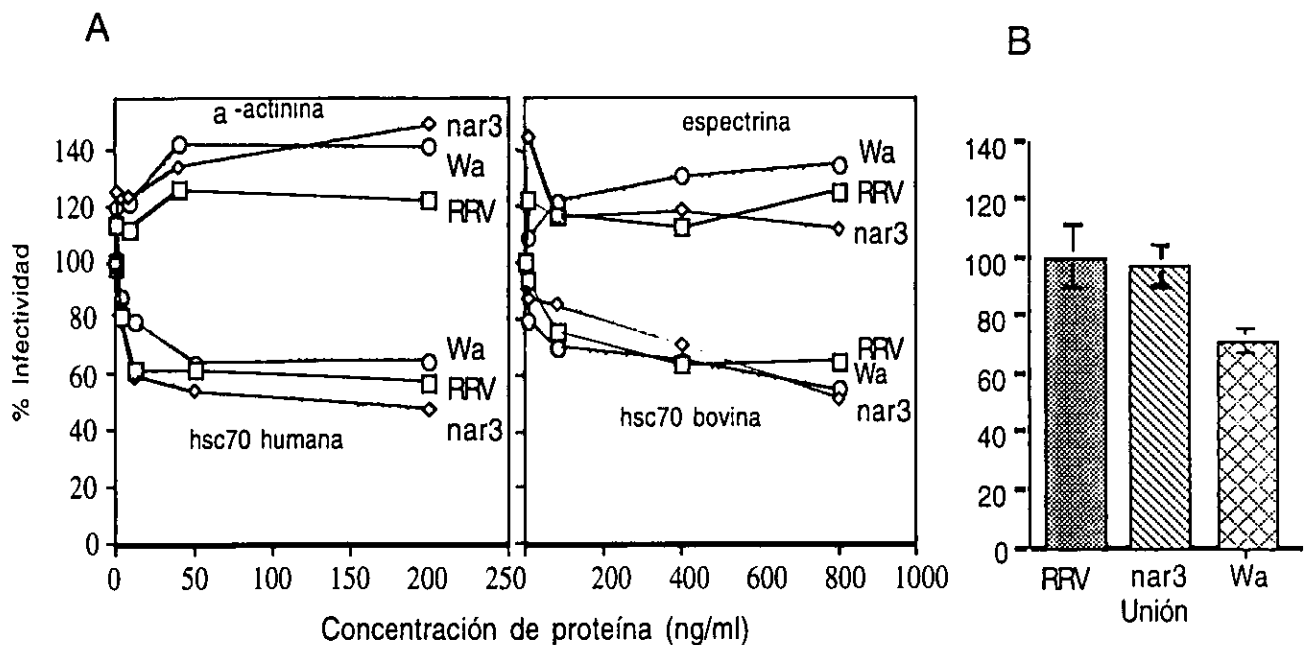


Figura. 7. La infectividad de los rotavirus es bloqueada por la proteína hsc70. Se incubaron en medio MEM en tubos eppendorff diferentes concentraciones de la proteína hsc70 o de las proteínas control como α -actinina y espectrina con los rotavirus RRV, nar3 y Wa durante 90 minutos a 37 °C. Como control, el virus se incubó con sólo MEM. (A). Para la infección, se adicionó el virus-proteína a las células MA104 y se incubó durante 45 minutos a 4 °C. Posteriormente, el inóculo fue removido, las células fueron lavadas y se adicionó MEM para incubarlas durante 14 horas a 37 °C. (B). Para la unión, se adicionó el virus-proteína a las células MA104 y se incubó durante 60 minutos a 4 °C. Posteriormente el inóculo fue removido, las células fueron lavadas y lisadas para cuantificar el virus unido por la técnica de ELISA. Las barras representan el error estandar de al menos tres experimentos, realizados por duplicado.

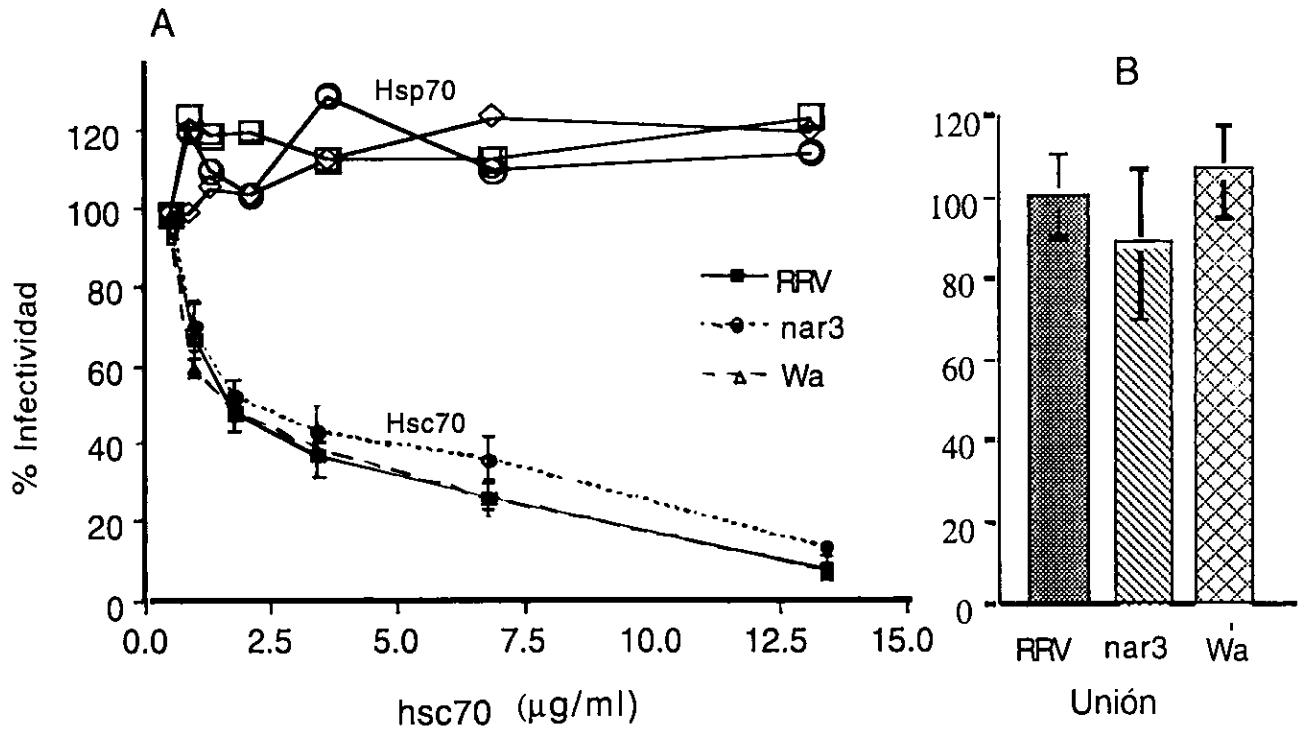


Figura. 8. La proteína hsc70 humana, pero no la hsp70, inhibe la infectividad de los rotavirus al adicionarse después de unir el virus a la célula. Células MA104 fueron incubadas con los rotavirus RRV, nar3 o Wa durante 45 minutos a 4 °C, como se describe en materiales y métodos. (A). Para la infección, a las células se les adicionó hsc70 o hsp70 (como proteína control), a una concentración de 0.83 hasta 13.28 µg/ml, en MEM por 30 minutos a 4 °C. Las placas se incubaron durante 14 horas a 37°C y la infección se detectó por la técnica de inmunoperoxidasa. (B). Para la unión, a las células se les adicionó hsc70 a una concentración de 13.28 µg/ml, en MEM por 60 minutos a 4 °C. Posteriormente el inóculo fue removido, las células fueron lavadas y lisadas para cuantificar el virus unido por la técnica de ELISA. Las barras representan el error estandar de al menos tres experimentos, realizados por duplicado.

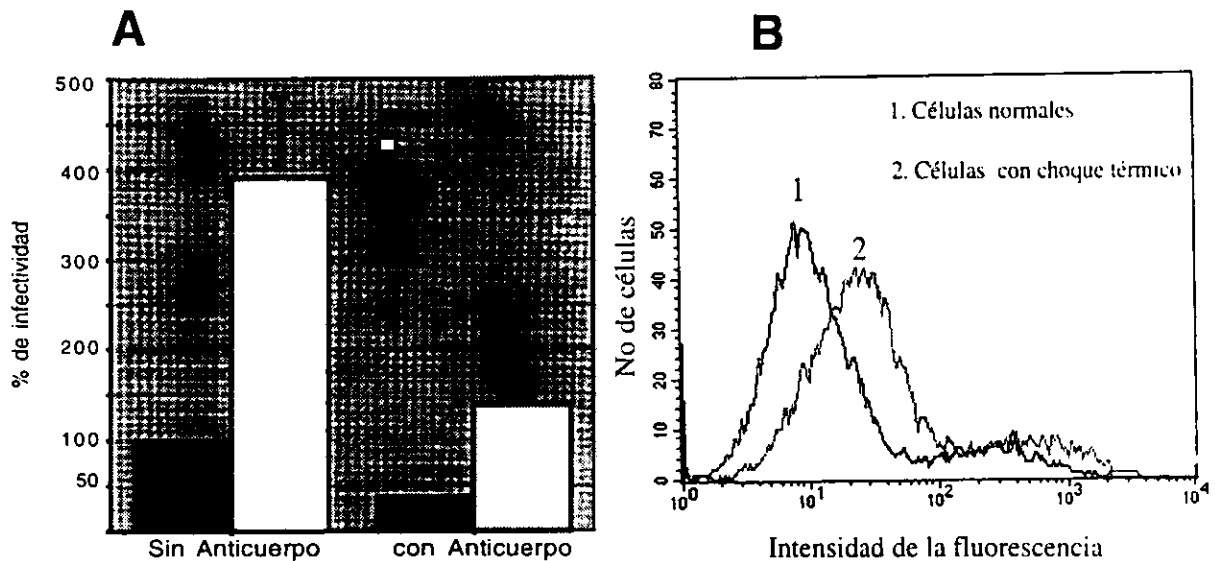


Figura. 9. El choque térmico en las células MA104 aumenta la infectividad de los rotavirus. Las células en placas de 96 pozos se sometieron a choque térmico durante 20 minutos a 47 °C. El medio fue removido cuidadosamente y fueron incubadas con aproximadamente 500 unidades formadoras de focos (uff) del rotavirus Wa por adsorción durante 60 minutos a 37 °C. (A). 1). Células infectadas sin Ac contra hsc70. 2). 80 µg/ml de Acs contra hsc70 se incubaron con las células en placas de 96 pozos durante 90 minutos a 37 °C. Las placas se pre-enfriaron sobre hielo durante 5 minutos, se eliminó el Ac y se infectaron con el rotavirus Wa por adsorción durante 45 minutos a 4°C. Los Ac preinmunes se utilizaron como control. Las placas se lavaron, se adicionó MEM y se incubaron durante 14 horas a 37 °C. Las barras representan el error estándar de al menos tres experimentos, realizados por duplicado. (B). Citometría de flujo comparando las células con choque térmico respecto a las células sin choque térmico. Se utilizó un Ac policlonal específico contra hsc70 que reconoce la región entre los aminoácidos 556-568. 1). Hsc70 en células normales. 2). Hsc70 en células con choque térmico. Como control se utilizó un Ac policlonal del mismo isotipo.

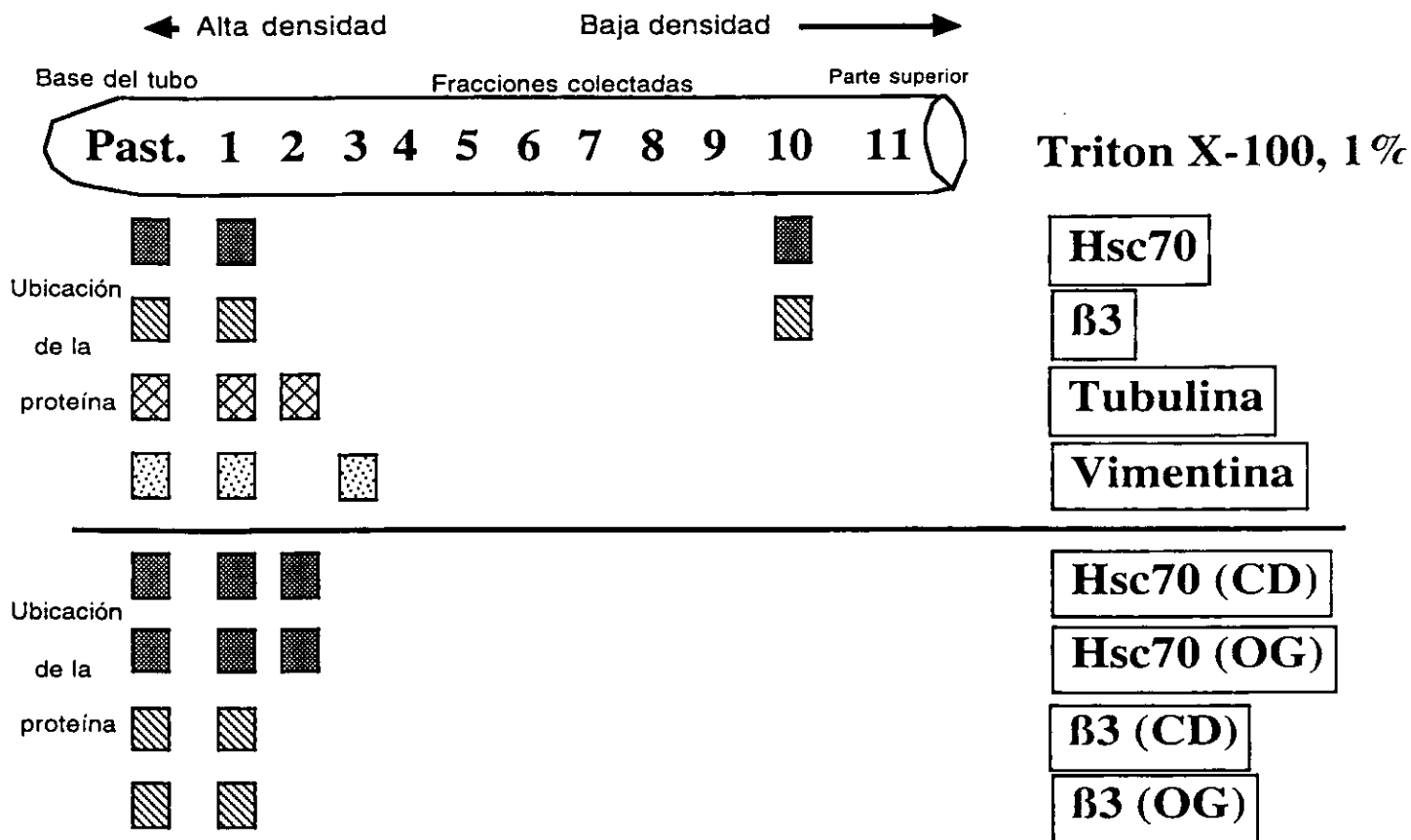


Figura. 10. Las proteínas hsc70 y la integrina $\beta 3$ se encuentran en los microdominios lipídicos. "rafts" en las células MA104. Las células se lisaron con 1% de Tritón X100 durante 30 minutos y sobre el lisado, en 40% de sacarosa, se hizo un gradiente lineal de sacarosa (5% - 30%) sin tritón X100. El gradiente fue centrifugado durante 15 - 22 hr a 200.000 x g en un rotor SW41. Las fracciones se recolectaron desde la parte inferior del tubo hasta la superior por aspiración (fracciones 1 al 11). Cada fracción se precipitó con 5 volúmenes de acetona y las fracciones se analizaron por Western blot utilizando Acs específicos. Como control, se hizo el mismo procedimiento a células previamente tratadas con ciclodextrina (CD), para retirar el colesterol de la membrana citoplasmática o a células lisadas con el detergente octil glucósido (OG) al 0.8%, en lugar del 1% de Tritón X100, para solubilizar los microdominios lipídicos. Los cuadros rellenos indican la presencia de la correspondiente proteína en cada fracción.

Tabla 1. Proteínas identificadas por el análisis de secuencia, de las las fracciones obtenidas a partir del extracto de octil glucósido de células MA104 .

Fracción (kDa)	No péptidos secuenciados	proteína correspondiente	PM (kDa)	Identidad
110	1	Integrina Beta-3	90	14/14 (100%)
	1	hsp 70	70	18/18 (100%)
	1	Filamina	270	13/13 (100%)
	1	Espectrina	260	12/12 (100%)
75	1	hsc70	73	12/12 (100%)
	1	hsc70	73	16/16 (100%)
	1	Actinina	190	12/13 (92%)
	1	Actinina	190	15/18 (83%)
57	1	PDI-like Erp57	57	16/16 (100%)
	1	hsc70	73	23/23 (100%)
45	1	α -Actina	45	16/16 (100%)
	1	α -Actina	45	18/18 (100%)
30	1	α -Actina	45	16/16 (100%)
	1	α -Actina	45	18/18 (100%)

Tabla 1. Resumen de los estudios realizados a las proteínas identificadas por el análisis de secuencia, de las fracciones obtenidas a partir del extracto de octil glucósido de células MA104 .

Proteína correspondiente	Presencia en la superficie celular	Acs contra la proteína inhiben la infección	La proteína soluble inhibe la infección	Aumenta la infección al transfectar el gene de la proteína
Integrina Beta-3	si	si	si	si
hsp 70	no	no	no	-
Filamina	no	no	no	-
Espectrina	no	no	no	-
hsc70	si	si	si	?
α -Actina	no	no	si	-
PDI-like Erp57	*	si	si	?

Simbolos: (*) Sin realizarse. (-) no se hizo por considerar que no está implicada en el proceso infeccioso de los rotavirus. (?) PDI aún no se ha hecho, hsc70 se está realizando.

DISCUSSION

DISCUSION

Los receptores para rotavirus en células MA104 involucran a una o varias glicoproteínas N-glicosiladas, cuya función de receptor depende de esfingolípidos y de la presencia del colesterol.

Al abordar el primer objetivo del trabajo, que consistió en caracterizar la naturaleza bioquímica del (o los) receptore(s) de rotavirus independiente(s) de ácido siálico en células MA104, encontramos que al tratar las células con tunicamicina, inhibidor de la N-glicosilación, la infectividad de los rotavirus RRV y nar3 disminuyó en aproximadamente 50%, sugiriendo que estos rotavirus interactúan con glicoproteínas N-glicosiladas durante el proceso de entrada a la célula. Al tratar las células con un inhibidor de O-glicosilación, la infectividad de nar3 y Wa aumentó hasta en un 50%. Quizás el retirar los O-azucares de las glicoproteínas permite que los rotavirus tengan un mejor acceso a su(s) molécula(s) receptora(s). El tratamiento de las células MA104 con PDMP, un inhibidor de la biosíntesis de glicolípidos, también disminuyó la infectividad de los tres rotavirus, RRV, nar3 y Wa (Tabla 1. Artículo anexo "Biochemical characterization of rotavirus receptors in MA104 cells"). El efecto de PDMP y tunicamicina se puede deber a una alteración en las proteínas implicadas en el proceso de entrada de los rotavirus, que están presentes en la membrana citoplasmática, ya que estos inhibidores metabólicos no afectaron la unión del virus ni alteraron la infectividad cuando se añadieron después de la adsorción de los rotavirus a la célula, descartando así la posibilidad de que tengan un efecto negativo sobre la replicación del virus.

Además de los inhibidores metabólicos, el tratamiento con ciclodextrina tuvo un efecto drástico en la infectividad de los rotavirus (Tabla 1. Artículo "Biochemical characterization of rotavirus receptors in MA104 cells"), sugiriendo que el colesterol también está involucrado en la entrada de los rotavirus a la célula.

La disminución en la infección de RRV, nar3 y Wa, al modificar las N-glicoproteínas, los glicolípidos y el colesterol, sugiere que en el proceso de infección de los rotavirus, está involucrado un complejo molecular en la membrana. Recientemente, se describió la existencia de microdominios lipídicos funcionales en la membrana celular (denominados "rafts") que están compuestos de colesterol, glicoesfingolípidos (gangliósidos entre otros) y un grupo específico de proteínas asociadas. Se cree que estos "rafts" funcionan como plataformas especializadas para seleccionar las proteínas y determinar su destino (72). Debido a que la unión de RRV, nar3 y Wa a las células depletadas de colesterol no se vio afectada, pero sí su infectividad, suponemos que los receptores de rotavirus pudieran estar formando parte de algún microdominio lipídico. Se ha observado que al eliminar el colesterol de la membrana citoplasmática, los "rafts" se desensamblan y como consecuencia, existe una alteración o modificación en la distribución de los componentes de la membrana, aunque éstos se mantienen con la misma abundancia, es decir, la cantidad de moléculas que se extraen con ciclodextrina, de la membrana citoplasmática, aparte

del colesterol, es muy baja. (34), (49). En el caso de rotavirus, la eliminación del colesterol con ciclodextrina no afectó su unión, lo que indica que los componentes de la membrana se conservaron: sin embargo, al desensamblarse éstos la infección no progresó. Estas observaciones correlacionan con el hecho que al tratar las células MA104 con ciclodextrina no se afecta la intensidad de la inmunofluorescencia para las proteínas hsc70 e integrina $\beta 3$, pero sí su distribución. Mientras que en ausencia de ciclodextrina la fluorescencia esta distribuida en forma homogénea en la membrana plasmática, en células tratadas se observa la fluorescencia en zonas discretas donde hay una mayor intensidad (datos no mostrados).

Los efectos observados con tunicamicina, PDMP y ciclodextrina sobre la infección de rotavirus, parecen ser específicos, y no un efecto tóxico generalizado, ya que no se afectó la infección de las células tratadas con tales compuestos por otros virus como poliovirus y reovirus; además, las células MA104 recuperaron su susceptibilidad a la infección por rotavirus después de retirar los tres compuestos.

En resumen, con los datos hasta aquí descritos, concluimos que el (los) receptor(es), para rotavirus en células MA104 podría involucrar una o varias glicoproteínas N-glicosiladas, cuya función de receptor depende de los esfingolípidos y de la presencia de colesterol. Entre las proteínas N-glicosiladas pudieran estar las integrinas.

Al incubar células MA104 con el detergente octilglucósido al 0.2% (OG 0.2%) las células pierden su capacidad de unir a los rotavirus y consecuentemente, su susceptibilidad a la infección lo cual sugiere que el OG extrae moléculas de la superficie celular que son necesarias para la unión y la infección de los rotavirus. En concordancia con lo anterior, el extracto celular con OG, preincubado con el virus, inhibió tanto la unión como la infección de los rotavirus a células MA104. La actividad inhibitoria del extracto de OG se perdió al tratarlo con proteasas o hervirlo, pero no por el tratamiento con neuraminidasa, indicando que la naturaleza del componente inhibitorio es de naturaleza proteínica y que los AS asociados a los componentes del extracto no parecen participar en el efecto inhibitorio del mismo.

Al retirar el detergente de las células, éstas recuperan su susceptibilidad a la infección a las 8 horas de post-tratamiento (fig. 1A. Artículo "Biochemical characterization of rotavirus receptors in MA104 cells"). Este tiempo representaría el necesario para que la célula sintetice, transporte y acumule nuevamente el o los receptor(es) en la membrana necesarios para la infectividad eficiente del virus.

Para identificar los componentes del extracto de OG que bloquean la infectividad de rotavirus, aislamos dos fracciones proteínicas que conservaron su capacidad bloqueadora. Las dos fracciones de aproximadamente 75 y 57 kDa se utilizaron para generar antiseros contra cada una. Los sueros bloquearon la infectividad de los rotavirus y por inmunofluorescencia reconocen el mismo patrón en la superficie celular. Igualmente, por Western blot ambos sueros reconocieron el mismo patrón de proteínas.

lo que sugiere que los anticuerpos inhibitorios están dirigidos hacia las mismas moléculas en la superficie celular. En apoyo a esto, se encontró que las fracciones que tienen pesos moleculares aparentes correspondientes a 75 y 57 kDa contienen en común, la proteína hsc70.

Posteriormente, aislamos del extracto de OG cinco fracciones proteínicas que bloquearon la infectividad de los rotavirus y los péptidos derivados de cada una de las cinco fracciones proteínicas (110 kDa, 75 kDa, 57 kDa, 45 kDa y 30 kDa) se secuenciaron (Tabla 1. Resultados anexos). De las proteínas identificadas en 110 kDa y 75 kDa, solamente la integrina $\beta 3$ y la hsc70 parecen estar implicadas en el proceso infeccioso de los rotavirus (como se discutirá mas adelante). Las demás proteínas probablemente corresponden a fragmentos de proteínas contaminantes que no se eliminaron durante la extracción y manipulación de las muestras. Los datos preliminares, tratando las células con dos reactivos impermeables que son bloqueadores de grupos sulfidrilos, sugieren que la proteína reportada en la fracción de 57 kDa, similar a la disulfuro isomerasa (PDI -like Erp57), puede también estar implicada en el proceso de entrada de los rotavirus a la célula.

Algunos reportes indican que la proteína actina, identificada en las fracciones de 45 kDa y 30 kDa, se encuentra en la superficie de las células endoteliales (16, 63); sin embargo, no la detectamos en la superficie de células MA104 por inmunofluorescencia o citometría de flujo. Debido a la homología estructural entre la actina y la hsc70 (22, 36, 41) es posible que el efecto inhibitorio de las fracciones de 45 y 30 kDa esté determinado por actina mimetizando el papel de hsc70. Otra posibilidad es que el efecto inhibitorio de actina sea un artefacto experimental que ocurre porque actina probablemente se une *in vivo* al rotavirus cuando este está intracelularmente y en el ensayo, al incubar la actina con los rotavirus, igualmente la actina se está uniendo al virus y esto impide que el virus reconozca a los receptores celulares, lo que lleva a una disminución en la infección.

La integrina $\beta 3$ es un co-receptor post-uni3n para los rotavirus

Para estudiar el papel que tiene la integrina $\beta 3$ sobre la infectividad de rotavirus, realizamos ensayos de infectividad en presencia de Acs específicos contra la integrina $\beta 3$.

La integrina $\beta 3$ puede formar heterodímeros con las subunidades αIIb y αv , por lo que también se utilizaron Acs contra estas subunidades. Los Acs policlonales contra αv y $\beta 3$ bloquearon parcialmente la infectividad de las tres cepas de rotavirus, aunque el efecto no fue aditivo cuando se utilizó la mezcla de ambos Acs. Esto es lo que se espera si el virus utiliza regiones equivalentes en las dos subunidades y los Acs están reconociendo esta región. Sin embargo, pudiera ocurrir que el virus reconociera dos sitios diferentes en cada una de las subunidades αv y $\beta 3$, si fuese este el caso se esperarí3 un efecto aditivo al

bloquearlos con Acs policlonales. La subunidad αv puede formar heterodímeros con otras subunidades β , por lo que no se sabe si el efecto inhibitorio del Ac contra αv ocurre por impedimento estérico.

También evaluamos los ligandos naturales como la vitronectina, fibronectina, colágeno o laminina en el bloqueo de la infectividad de los rotavirus. Con excepción de laminina, los ligandos bloquearon la infectividad de las tres cepas de rotavirus, siendo más efectiva la vitronectina. Debido a que laminina y otras proteínas no relacionadas no bloquearon la infectividad de los rotavirus, consideramos que el bloqueo de vitronectina, fibronectina y colágeno es específico.

Tanto los Acs contra $\beta 3$ como la vitronectina no afectan la unión del virus a la célula, sin embargo, sí bloquean la infectividad de éste, aún cuando el virus se adsorbe a la célula previamente a la adición del Ac o de vitronectina, lo cual sugiere que $\beta 3$ participa en un paso posterior a la unión del virus a la célula. El efecto inhibitorio de los Acs o la vitronectina puede ser por impedimento estérico, no permitiendo que el virus se una a la integrina, o porque modifique la estructura de la integrina, impidiendo que los rotavirus la reconozcan. La vitronectina y los Acs contra $\beta 3$ no bloquearon la infección de rotavirus cuando se adicionaron después que el virus había penetrado a la célula, lo que descarta la posibilidad que la vitronectina pueda estar activando señales en la célula que alteren la replicación de los rotavirus intracelularmente.

Las células CHO transfectadas con los genes de las integrinas $\alpha IIb\beta 3$ (células CHO-A5) y $\alpha v\beta 3$ (células CHO-VNRC) para expresar dichas proteínas en la superficie celular y que fueron descritas previamente (15), presentaron un aumento de 2.5 a 3.7 veces en su susceptibilidad a los rotavirus Wa, nar3 y RRV comparadas con las células CHO no transfectadas. El aumento en la infectividad de estos virus obedeció a un aumento en la expresión de $\alpha IIb\beta 3$ en células CHO-A5 y $\alpha v\beta 3$ en células CHO-VNRC, ya que la infectividad se bloqueó con vitronectina o con Ac específicos contra $\beta 3$, confirmando así la participación de estas integrinas en la infección con rotavirus.

Para estudiar si los rotavirus pueden emplear un repertorio mayor de integrinas en el proceso de entrada, utilizamos un panel de Acs dirigidos contra éstas, midiendo su capacidad para bloquear la infección. Los resultados fueron similares a los reportados para las integrinas $\alpha 2\beta 1$, $\alpha x\beta 2$ y $\alpha 4\beta 1$ (13), (38); sin embargo, el mayor grado de inhibición de la infectividad por rotavirus se obtuvo con Acs específicos contra $\alpha v\beta 3$ y con el ligando específico (vitronectina) de esta integrina. La combinación de los Acs contra diferentes integrinas, solamente se observó un efecto aditivo en la inhibición de la infección

cuando se usaron Acs contra las cadenas $\alpha 2$ y $\beta 3$, sugiriendo que los rotavirus utilizan estas dos integrinas en diferentes etapas del proceso infeccioso. Probablemente el efecto inhibitorio observado con los Ac contra las cadenas $\beta 1$ y αv , que son las subunidades de $\alpha 2\beta 1$ y de $\alpha v\beta 3$, respectivamente, es por impedimento estérico.

La proteína hsc70 está presente en la superficie de las células MA104 y puede ser uno de los receptores para rotavirus.

Al estudiar la localización celular de las proteínas identificadas en la fracción de 75 kDa del extracto de OG, encontramos que la proteína hsc70 está en la superficie de las células MA104. Se desconoce cómo ésta llega a la membrana citoplasmática, ya que carece de una secuencia señal para su transporte a RE o al aparato de Golgi. La hsc70 es una proteína ubicua que se localiza comunmente en el núcleo y el citoplasma de la célula; sin embargo, también se ha localizado en la superficie de varias líneas celulares, de células infectadas con virus, de células de la espermatogénesis y de células normales después de un choque térmico (6, 10, 39, 58, 64, 66).

Para evaluar el papel de hsc70 en la infectividad de rotavirus, utilizamos Acs específicos contra la proteína, así como la proteína hsc70 de distintos orígenes. Al igual que los Acs contra la integrina $\beta 3$, los Ac monoclonales contra la hsc70 bloquearon la infectividad pero no la unión de los rotavirus a la célula, lo que sugiere que el bloqueo de la infectividad ocurre en un paso posterior a la unión. El uso de la proteína hsc70 mostró resultados un poco diferentes ya que inhibe la infectividad de los tres rotavirus en la misma proporción (50%), mientras que los ensayos de unión inhiben 30% a la cepa humana Wa, sin afectar la unión de las cepas RRV y nar (Fig. 7. Resultados adicionales). Esto sugiere nuevamente que la proteína hsc70 bloquea la infección después de que el virus se ha unido a otras moléculas celulares, aunque el caso de la cepa humana podría ser parcialmente distinto. Añadiendo la proteína hsc70 después de unir el virus a la célula, el bloqueo en la infectividad fue superior a 90%, apoyando la idea que la interacción del virus con la proteína hsc70 tiene lugar en un paso posterior a la unión inicial del virus con la célula. En un ensayo de unión, adicionando la proteína hsc70 después de unir el virus a la célula, no hubo diferencias con el control, descartando que la inhibición en la infección fue porque hsc70 desplazó la unión del virus con la célula. La proteína hsc70 tiene un dominio hidrofóbico de 30 kDa en el extremo carboxi-terminal, a través del cual interactúa con péptidos para facilitar su plegamiento, ensamble y desensamble adecuados. Probablemente, la hsc70 solamente reconoce regiones hidrofóbicas del virus, las cuales pueden exponerse cuando éste se ha unido con alguna(s) molécula(s) de la célula, lo cual podría inducir cambios conformacionales en la partícula viral.

Queda por determinar si hsc70 reconoce algunas regiones hidrofóbicas de las dos proteínas de la capa externa del virus, VP4 y de VP7, o de la proteína de la capa intermedia (VP6). Sin embargo, en

resultados preliminares utilizando la técnica de ELISA encontramos que hsc70 reconoce a la partícula viral que carece de las dos proteínas de la capa externa, en donde la proteína expuesta es VP6. Pudiera estar ocurriendo que los rotavirus requieren para la unión a la proteína hsc70 que se den unas primeras uniones con otras moléculas como las integrinas. Los diferentes pasos, en la unión con varias integrinas, facilitaría cambios conformacionales en los virus que le permiten exponer la proteína hidrofóbica VP6 para que ocurra la unión con la hsc70. La proteína hsc70 unida al virus pudiera actuar como chaperona y facilitar la entrada de los rotavirus al citoplasma celular.

La participación de hsc70 en la entrada de los rotavirus a la célula parece ser específica, ya que la proteína hsp70 o Acs monoclonales contra ésta no bloquearon la infección, a pesar de que la proteína es 84% homóloga a hsc70 (70). Igualmente, Acs contra hsc70 no bloquearon la infectividad de otros virus como polio y reovirus (Fig. 2. Resultados adicionales).

La penetración del rotavirus a la célula puede ser un proceso de varios pasos.

Con base en los resultados obtenidos en el laboratorio, se ha propuesto que la penetración de rotavirus ocurre en tres pasos: 1o. Algunos rotavirus de origen animal como RRV se unen a moléculas de ácido siálico (AS) presentes en la membrana a través de la proteína VP8. Esta interacción podría ser de naturaleza promiscua y por sí sola no conduciría a la penetración viral. 2o. Como resultado de la primera interacción con AS, el virus podría sufrir un cambio conformacional, que le permite interactuar con una segunda molécula de manera independiente de AS, ahora a través de VP5. Debido a que el virus no depende de AS para infectar la célula, se ha propuesto que este virus ya posee dicho cambio conformacional, lo que hace que no requiera de la primera interacción con AS y por lo tanto, sea capaz de unirse directamente al segundo receptor AS-independiente (86). 3o. El tercer paso de la penetración también incluiría una interacción entre una molécula celular carente de AS y probablemente un dominio de VP5 y/o VP7 y quizás de VP6.

La molécula que contiene el AS en las células que es la responsable de la primera interacción con los rotavirus de origen animal, no se ha identificado aunque se ha propuesto que el gangliósido GM1 y/o el gangliósido GM3 podrían ser esa molécula (25, 48, 84). Otra posibilidad es que la primera interacción con AS sea directamente con el AS de las integrinas que, como se mencionó anteriormente, juegan un papel importante durante la infectividad viral y/o con el AS de otras moléculas, a través de interacciones parcialmente inespecíficas que induzcan los cambios conformacionales necesarios en el virus para interactuar con otros sitios de manera más específica.

De manera general, se piensa que las primeras interacciones de un virus con su célula hospedera simplemente facilitan una adsorción más estrecha a la superficie celular, a través de interacciones más específicas, como es el caso del virus herpes simplex, donde previamente a la unión específica, el virus interactúa con el heparan sulfato de los proteoglicanos. Sin embargo, en ciertos casos, la molécula

celular con la que un virus interacciona inicialmente, puede adicionalmente servir como un receptor funcional para la entrada del virus; la interacción del virus VIH con la molécula CD4 es un ejemplo de esto.

La segunda interacción de los rotavirus con la célula se hizo evidente a través de la caracterización de las variantes nar3, cuya infectividad ya no depende de la interacción inicial del virus con AS. En este caso, se encontró que la variante nar3 se une a la célula mediante la interacción de la proteína VP5 con la integrina $\alpha 2\beta 1$ (85), lo cual correlaciona con el hecho de que la proteína VP4 contiene la secuencia de los tripéptidos DGE e IDA, reconocidos como sitios de interacción con las integrinas $\alpha 2\beta 1$ y $\alpha 4\beta 1$, respectivamente (13). Sin embargo, Acs contra $\alpha 2$ no bloquean la infectividad de nar3 y Wa cuando se adicionan a la célula después de agregar el virus, por lo que el efecto inhibitorio de estos Acs no es en un paso posterior a la unión. Sabemos que VP5 está implicada en esta segunda interacción, pero existe la posibilidad de que VP7 (que contiene la secuencia de los tripéptidos GRP y LDV, ligandos para las integrinas $\alpha x\beta 2$ y $\alpha 4\beta 1$, respectivamente), participe en ésta, ya que se observaron inhibiciones parciales en la infección cuando la célula se pre-incubó con Acs contra las integrinas $\alpha 2\beta 1$ y $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$ y $\alpha x\beta 2$.

La tercera interacción de los rotavirus con su célula hospedera durante la penetración se evidenció por experimentos de competencia entre las tres cepas de rotavirus (RRV, nar3 y Wa), siendo la cepa humana Wa capaz de bloquear la infectividad de RRV, nar3 y de otra cepa de origen humano (DS1). Con base en los experimentos descritos en secciones anteriores, las proteínas hsc70 y $\alpha v\beta 3$ podrían estar involucradas en esta tercera interacción.

Cuando evaluamos el papel de los Acs contra las integrinas observamos que el efecto inhibitorio de los Acs fue más drástico cuando éstos se añaden después de unir el virus a la célula, que si se adicionan antes de unir el virus. Probablemente, en la(s) primera(s) interacción(es) del virus con la célula, se inducen cambios conformacionales en las integrinas que exponen dominios que hacen más estrecha la unión de los Acs a las proteínas y por tanto, bloquean más eficientemente la infección. Igualmente, observamos que al mezclar los Acs contra las integrinas αx , $\beta 2$, $\beta 3$ y la hsc70 tienen efecto aditivo en bloquear la infección de los rotavirus, tanto cuando se añaden antes de unir el virus, como cuando se añaden después de unir el virus a la célula, alcanzando un bloqueo del 99% en este último caso (Fig. 4). Esto sugiere que las integrinas y la hsc70 probablemente son la mayoría de las moléculas, sino es que todas las que el rotavirus utiliza para ingresar a la célula.

La interacción de los rotavirus con la integrina $\alpha v\beta 3$ es independiente del motivo RGD, ya que péptidos que contienen la secuencia RGD, no bloquearon la infectividad de rotavirus. La interacción de los

hantavirus con la integrina $\alpha v\beta 3$ es igualmente RGD independiente, por lo tanto para identificar la proteína viral de rotavirus que se une a la integrina $\alpha v\beta 3$, comparamos la secuencia de las proteínas virales que usan los hantavirus para unirse a la célula, con las secuencias de las proteínas de la capa externa de rotavirus. Encontramos una región conservada de la proteína VP7, entre el aminoácido 167 a 175, con la proteína G1G2 de hantavirus. Resultados preliminares señalan que péptidos sintéticos de esta región homóloga son capaces de bloquear la infección de los rotavirus, lo que indicaría que VP7 es la proteína que interactúa con la integrina $\alpha v\beta 3$. Estos y otros estudios que actualmente se realizan con la proteína viral VP4, permitirán conocer más detalladamente las moléculas del virus que interaccionan con las moléculas de la célula que participan en el proceso de entrada y que han sido descritas en este estudio.

En conclusión, pensamos que durante la penetración los rotavirus interaccionan con diferentes moléculas en la superficie de la célula en un proceso que involucra varios pasos secuenciales y posiblemente cambios conformacionales tanto en el virus como en las moléculas celulares. En terminos generales, pensamos que existen tres grandes pasos en la penetración: 1o. El primer paso se caracteriza por la unión a ácido siálico y estaría involucrada la proteína viral VP8 y posiblemente los AS de gangliósidos o de integrinas. 2o. El segundo paso sería independiente de AS y estaría implicada la proteína VP5 junto con las integrinas $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha x\beta 2$. 3o. En el tercer paso, estarían participando VP5 y/o VP7 y las proteínas $\alpha v\beta 3$ y hsc70, aunque hsc70 podría representar un paso común, actuando como chaperona para facilitar la entrada del virus al citoplasma de la célula, de los tres rotavirus RRV, nar3 y Wa.

De esta manera, pensamos que las moléculas celulares que participan en la penetración de rotavirus pudieran estar formando un complejo que incluye gangliósidos, integrinas y hsc70. En este sentido, hemos encontrado que la integrina $\beta 3$ y hsc70 están en los microdominios lipídicos de baja densidad ("rafts"). Es probable que los rotavirus requieran de la organización de los microdominios lipídicos para que su penetración a la célula sea eficiente.

El tropismo celular y la especificidad de órgano.

En virología susceptibilidad se define como la capacidad que tiene una célula o un animal de ser infectados. La infección de una célula susceptible no conlleva a que se de la replicación del genoma viral y la producción de progenie. Una infección productiva ocurre en células permisivas en las que la replicación del genoma y el ensamblaje de las partículas virales, resultan en una progenie infecciosa. En el caso de rotavirus, no se sabe si hay células susceptibles y no permisivas para la infección; en cambio, sí existen células permisivas que son poco susceptibles, como las L929, HEp2 (3), BHK-21, CHO, 3T3 y HeLa, entre otras. Las líneas celulares poco susceptibles para rotavirus requieren de una multiplicidad alta para

ser infectadas; sin embargo, son capaces de unir virus y de sostener una replicación del genoma viral y producir progenie viral, cuando el virus se introduce por lipofección (3) y (datos no publicados de nuestro laboratorio). Estos resultados muestran que la penetración a través de la membrana de estas células es el paso limitante de la infección, ya que aunque poseen las moléculas de superficie responsables de la unión de rotavirus, son incapaces de mediar eficientemente su penetración al citoplasma para iniciar la transcripción y replicación de su genoma. Al parecer, la presencia de los receptores celulares para los rotavirus es uno de los determinantes de rango de huésped y de tropismo celular.

Por los resultados de este trabajo, pensamos que más de una molécula celular está involucrada en la entrada de los rotavirus. Aunque no sabemos si estos receptores se usan de manera alternativa o actúan en conjunto modulando o complementando sus funciones, las evidencias sugieren lo último.

Un ejemplo del uso de receptores alternativos ha sido descrito para el VIH. En este caso, a la molécula CD4 se le ha llamado receptor y a otras moléculas, como las quimocinas, que participan en las interacciones del VIH con la célula huésped, se les ha denominado co-receptores. Por ejemplo, en linfocitos T, CD4 es el receptor primario que une al virus eficientemente, pero éste no es importante para unir el virus en macrófagos, células dendríticas y de la microglia; en estas células CD4 está en muy bajas cantidades y los co-receptores complementan eficientemente la unión del VIH. Al transfectar genes de moléculas de adhesión como las ICAM-1, se ha observado que la infección del VIH puede aumentar hasta diez veces. Esto sugiere que múltiples interacciones del virus con estos co-receptores son tan eficientes en mediar la unión del virión, como la interacción de gp120 con CD4. En las células con muy pocas cantidades de CD4 se hace importante la sobre-expresión de dichos co-receptores (80).

In vivo, los rotavirus tienen un tropismo hacia los enterocitos diferenciados de las vellosidades del intestino delgado (19). *In vitro*, la infección eficiente por rotavirus está restringida a líneas celulares epiteliales de origen renal (por ejemplo, MA104 de riñón de mono) e intestinal (por ejemplo, células de cáncer de colon CaCo-2).

Al analizar individualmente la presencia de integrinas y hsc70 en diversas líneas celulares, susceptibles y poco susceptibles, encontramos que se encuentran expuestas en la superficie de las células analizadas, lo cual, por sí mismo, no explica su susceptibilidad. Una posibilidad es que, además de la presencia de las integrinas y hsc70, se requiera que dichas proteínas estén en una organización especial, por ejemplo, formando un complejo, para permitir que ocurra eficientemente la infección. Dicho complejo puede ser particular de cada célula. Esto explicaría que al tratar las células con ciclodextrina no se afecte la unión del virus a la célula, pero si se afecte severamente la infección porque se altera la conformación del complejo, alterándose la actividad receptora, sin alterar la presencia de los componentes. También puede estar ocurriendo que las diferencias en la susceptibilidad se deban a que diferentes células no poseen todas las moléculas responsables de la internalización del virus, no estén en las cantidades adecuadas o presentan

isoformas. Esto explica que después de tratar las células con PDMP o con tunicamicina, no se altere la unión del virus a la célula. En este caso, puede ocurrir que no se afectan todas las moléculas que el rotavirus utiliza para su primer unión, pero se puede estar afectando la cantidad de algún componente del complejo y esto afecta la eficiencia de la infección.

En cierta forma el intestino es un órgano sometido a constante estrés, porque está expuesto constantemente a microorganismos del medio ambiente, patógenos o no y posee una rica flora microbiana. Igualmente está expuesto a cambios drásticos en el pH, parásitos, sustancias irritantes que incluyen aquéllas con radicales libres como el alcohol, las drogas medicinales, etc. Todas estas condiciones pueden hacer que la presencia de hsc70 en la membrana citoplasmática de las células intestinales sea importante. Debido a ésto, resulta imperioso verificar que la hsc70 este *in vivo* en la superficie de las células del intestino.

Conclusiones

1. Por los estudios realizados con los inhibidores metabólicos, así como por la caracterización bioquímica de los receptores celulares, podemos concluir que los receptores para rotavirus en células MA104 involucran a una o varias glicoproteínas N-glicosiladas, cuya función de receptor depende de esfingolípidos y de la presencia de colesterol.
2. La integrina $\beta 3$ y la proteína hsc70 participan en la infección en un paso posterior a la unión, probablemente en la penetración..
3. Hemos encontrado que la integrina $\beta 3$ y la proteína hsc70 están en los microdominios lipídicos de baja densidad ("rafts").
4. Las moléculas celulares que participan en la penetración de los rotavirus pudieran estar formando un complejo que incluye gangliósidos, integrinas y hsc70. Es probable que los rotavirus requieran de la organización de los microdominios lipídicos para que su penetración a la célula sea eficiente.

Perspectivas

Las células epiteliales MA104 de origen renal han sido una herramienta útil en la búsqueda e identificación de moléculas candidatas a receptor de los rotavirus; de su estudio sabemos que las integrinas y la hsc70 podrían funcionar como receptores. Es imperioso verificar si éstas moléculas están presentes *in vivo* en los enterocitos de las vellocidades del intestino delgado.

La disminución en la infectividad de los rotavirus al modificar las n-glicoproteínas, glicolípidos y el colesterol, sugiere que durante este proceso está involucrado un complejo molecular en la membrana, probablemente en microdominios lipídicos ("rafts"). Es importante determinar si $\alpha v\beta 3$ y hsc70 están formando un complejo, ya sea a través de una asociación estrecha entre ellas o solamente compartiendo el mismo dominio lipídico en esos microdominios. Con este propósito, podrían realizarse experimentos de coinmunoprecipitación.

Igualmente, es interesante investigar si los rotavirus se asocian a los "rafts" en algún momento durante el proceso asociación-penetración, lo cual sugeriría que estos microdominios (y sus componentes) juegan un papel importante en estos procesos.

Para comprender el papel de la(s) integrina(s) en la unión y penetración de los rotavirus a la célula, podría evaluarse el papel que tiene cada una de estas moléculas, así como de variantes mutagenizadas, sobre la infectividad de los rotavirus en células transfectadas con los genes de las integrinas correspondientes. La idea sería utilizar líneas celulares que normalmente no expresen las integrinas a estudiar.

In vitro, las células MA104 son útiles para el estudio del mecanismo de unión y penetración de los rotavirus a su célula hospedera. Es interesante analizar el papel que tienen la proteínas virales que conforman la capa externa del virus VP7 y VP4 (y sus productos VP5 y VP8) así como VP6, de manera independiente, en la infección a células MA104; específicamente, sería útil realizar ensayos de unión de las proteínas virales a cada una de las moléculas identificadas como posibles receptores.

Bibliografia

1. **Arias, C. F., P. Romero, V. Alvarez, and S. Lopez.** 1996. Trypsin Activation Pathway of Rotavirus Infectivity. *J Virol.* **70**:5832 - 5839.
2. **Ball. J. M., and P. Tian, Zeng, C. Q.Y., Morris, A.P.&Estes, M.K.** 1996. Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. *Science.* **272**:101-104.
3. **Bass, D. M., M. R. Baylor, C. Chen, E. M. Mackow, M. Bremont, and H. B. Greenberg.** 1992. Liposome-mediated transfection of intact viral particles reveals that plasma membrane penetration determines permissivity of tissue culture cells to rotavirus. *J Clin Invest.* **90**:2313-20.
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**:602-10.
5. **Bergelson JM, C. B., Finberg RW, Hemler ME.** 1993. The integrin VLA2 binds Echovirus 1 and Extracellular Matrix Ligands by different Mechanisms. *J Clin invest.* **92**:232 - 239.
6. **Botzler, and g. L. Claus, Rolf D Issels and Gabriele Multthoff.** 1998. Definition of extracellular localized epitopes of Hsp70 involved in an NK immune response. *Cell Stress & Chaperones.* **3**:6-11.
7. **Carrasco, L.** 1995. Modification of membrane permeability by animal viruses. *Adv. Virus Res.* **45**:61-112.
8. **Chao-Tan, and O. N. Guo, Masami Mochizuki, Hideharu Ishida, Makoto Kiso, Yasuhiro Ohta, Takashi Susuki, Daisei Miyamoto, Kasuya I-P. Jwa Hidari, and Yasuo Suzuki.** 1999. Ganglioside GM1a on the cell surface is involved in the infection by human rotavirus KUN and MO strains. *Journal Biochem.* **126**:683-688.
9. **Chappell, and W. W. J. T.G., Schlossman D.M., Palter KB., Schlesinger MS., Rothman JE.** 1986. Uncoating ATPases is a member of the 70 kilodalton family of stress proteins. *Cell.* **45**:3-13.
10. **Chouchane, and F. S. B. Lotfi, Susana Sawasdikosol,R. Mark Simpson, and Thomas J. Kindt.** 1994. Heat-shock proteins expressed on the surface of human T cell leukemia virus type-I-infected cell lines induce autoantibodies in rabbits. *The Journal of infectious Diseases.* **169**:253-259.
11. **Clark, E. A., and a. J. S. Brugget.** 1995. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science.* **268**:233-239.

12. Clark, S. M., and J. Roth, Clark, M. L., Barnett, B.B & Spendlove, R.S. 1981. Trypsin enhancement of rotavirus infectivity: mechanism of enhancement. *Journal of Virology*. **39**:816-822.
13. Coulson, B. S., S. H. Londrigan, and D. J. Lee. 1997. Rotavirus contains intergrin ligand sequences and a disintegrin-like domain implicated in virus entry into cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **94**:5389-5394.
14. Desselberger, U. 1998. Prospects for vaccines against rotaviruses. *Reviews In Medical Virology*. **8** (1):43-52.
15. Díaz-González, F., J. Forsyth, B. Steiner, and M. H. Ginsberg. 1996. Trans-dominant inhibition of intergrin function. *Mol. Biol. Cell*. **7**:1939-1951.
16. Dudani, and G. P. AK. 1996. Endothelial cell surface actin serves as a binding site for plasminogen, tissue plasminogen activator and lipoprotein(a). *Br J. Haematol*. **95**:168-178.
17. 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.
18. Estes, M. K. 1996. Rotaviruses and their replication, p. 1625- 1655. *In* B. N. Fields and D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), *Fields Virology*, vol. 2. Lippincott-Raven, Philadelphia, Pa.
19. Estes, M. K., and J. Cohen. 1989. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol Rev*. **53**:410-49.
20. Estes, M. K., D. Y. Graham, and B. B. Mason. 1981. Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: molecular mechanisms. *J Virol*. **39**:879-88.
21. Fields, B. N. 1996. Reoviridae. *Virology*. Edited by B.N. Fields, D. N. Knipe, P. M. Howley, R. M. Chanock, J.L. Melnick, T.P. Monath, B. Roizman & S.E. Straus. New York" Raven Press:1553-1555.
22. Flaherty, K. M., and D. B. C. and Mackay, Kabsch, W. and Holmes, K.C. 1991. Similarity of the three-dimensional structures of actin and the ATPase fragment of a 70-kDa heat shock cognate protein. *Proc. Natl. Acad. USA*. **88**:5041-5045.
23. Flaherty, K. M., and C. a. M. Deluca-Flaherty, D.B. 1990. *Nature*. **346**:623-628.
24. Frydman, and J. a. F.-U. harti. 1994. Molecular chaperone functions of hsp70 and hsp60 in protein folding. *The Biology of heat shock proteins and molecular chaperones*. Cold spring Harbor Laboratory Press:251-283.
25. 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.

26. **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.
27. **Gavrilovskaya, and E. J. B. Irina N., Mark H. Ginnsberg, and Erich R. Mackow.** 1999. Cellular entry of hantaviruses wich cause hemorrhagic fever with renal syndrome is mediated by $\beta 3$ integrins. *Journal of Virology.* **73**:3951-3959.
28. **Gavrilovskaya, and M. S. Irina N., Robert Shaw, Mark H Ginnsberg, and Erich R. Mackow.** 1998. $\beta 3$ integrins mediate the cellular entry of hantaviruses that cause respiratory failure. *Proc. Natl. Sci. USA.* **95**:7074-7079.
29. **Gerlier, D.** 1998. Entrée des virus enveloppés á l'échelle moléculaire. *Virologie.* **2**:215-226.
30. **Gething, and M.-j. J. Sambrook.** 1992. Protein folding in the cell. *Nature.* **355**:33-45.
31. **Glass, R. I., P. E. Kilgore, R. C. Holman, S. X. Jin, J. C. Smith, P. A. Woods, M. J. Clarke, M. S. Ho, and J. R. Gentsch.** 1996. The epidemiology of rotavirus diarrhea in the United States: Surveillance and estimates of disease burden. *Journal Of Infectious Diseases.* **174 Suppl. 1**:S5-S11.
32. **Haas, T. A., and a. E. F. Plow.** 1994. Integrin -ligand interactions: a year in review. *Current Opinion in Celll Biology.* **6**:656-662.
33. **Hamilton T.E., S. J. M., Scott Baldwin, Charlotte Burke, Hitendra Patel, Jhon L. Rombeau, and Steven E Raper.** 1997. Efficient Adenoviral-Mediated Murine Neonatal Small Intestinal Gene Transfer is Dependent on αv Integrin Expression. *Journal of Pediatric Surgery.* **32**:1695-1703.
34. **Hannan, and a. M. E. L. A.** 1996. Traffic, polarity, and detergent solubility of a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein after LDL deprivation of MDCK cells. *J. Cell Biol.* **133**:1265-1276.
35. **Harlow, E., and D. Lane.** 1988. *Antibodies A laboratory Manual.* Edited by Cold Spring Harbor Laboratory:298 - 299.
36. **Haus U, and F. P. Trommeler P, Hartmann H, Lottspeich F, Noegel AA, Schleicher M.** 1993. The heat shock cognate protein from Dictyostelium affect actin polimerization through interaction with the actin-binding protein cap32/34. *Journal EMBO.* **12**:3763-3771.
37. **Haywood, A. N.** 1994. Virus receptors: binding, adhesion strengthening, and changes in viral structure. *J. Virol.* **68**:1-5.
38. **Hewish, M. J., Y. Takada, and B. Coulson.** 2000. Integrins $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha 4\beta 1$ can mediate SA11 rotavirus attachment and entry into cells. *J. Virol.* **74**:228-236.

39. **Hirai, I., and W. Q. Noriyuki Sato, Seiji Ohtani, Toshihiko Torigoe, and kokichi kikuchi.** 1998. Localization of pNT22 70 kDa heat shock cognate-like protein in the plasma membrane. *Cell Structure an function.* **23**:153-158.
40. **Hu D.D, C. F. B. I., and jeffrey W. Smith.** 1996. An allosteric Ca⁺⁺ binding site on the β 3-integrins that regulates the dissociation rate for RGD ligands. *The journal of Biological chemistry.* **271**:21745-21751.
41. **Hurley, J. H.** 1996. The sugar kinase/heat shock protein 70/actin superfamily: implications of conserved structure for mechanism. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **25**:137-162.
42. **Hynes, R.** 1992. Integrins: Versatility, Modulations, and Signaling in cell Adhesion. *Cell.* **69**:11-25.
43. **Isa, P., S. López, L. Segovia, and C. F. Arias.** 1997. Functional and structural analysis of the sialic acid-binding domain of rotaviruses. *J. of Virol.* **71**:6749-6756.
44. **Jacobson, R. M.** 1999. The current status of the rotavirus vaccine. *Vaccine.* **17**:1690-1699.
45. **Jindal, S., and a. M. Malkovsky.** 1994. Stress responses to viral infection. *Trends in Microbiology.* **2**:89-91.
46. **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.
47. **Kapikian, A. Z., Y. Hoshino, R. M. Chanock, and I. PerezSchael.** 1996. Jennerian and modified Jennerian approach to vaccination against rotavirus diarrhea using a quadrivalent rhesus rotavirus (RRV) and human-RRV reassortant vaccine. *Archives Of Virology. Suppl.* **12**:163-175.
48. **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.
49. **Klein, and G. G. U., and F. Fahrenholz.** 1995. Alteration of the myometrial plasma membrane cholesterol content with B-cyclodextrin modulates the binding affinity of the oxytocin receptor. *Biochem.* **34**:13784-13793.
50. **Kunicki T. J., D. S. A., and Brunhilde Felding-Habermann.** 1997. Molecular Determinants of Arg-Gly-Asp ligands specificity for β 3 integrins. *the Journal of Biological Chemistry.* **272**:4103-4107.
51. **Lindquist, S.** 1988. The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* **22**:631-677.
52. **Logan D, A.-G. R., Blakemore W, Curry S, Jackson T, King A, Lea S, Lewis R, Newman J, Parry et al.,.** 1993. Structure of a major immunogenic Site on Foot-and-Mouth Disease virus. *Nature.* **362**:566-568.

53. **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.
54. **Lopez-Buesa, and C. P. Pascual, and Elizabeth A. Craig.** 1998. The biochemical properties of the ATPase activity of a 70-kDa heat shock protein (Hsp70) are governed by the C-terminal domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**:15253-15258.
55. **Ludert, J. E., F. Michelangeli, F. Gil, F. Liprandi, and J. Esparza.** 1987. Penetration and uncoating of rotaviruses in cultured cells. *Intervirology*. **27**:95-101.
56. **Lundgren, O., and A. T. P. Peregrin, Kordasti, S, Uhnoo, I.& Svensson, L.** 2000. Role of the enteric nervous system in the fluid and electrolyte secretion of rotavirus diarrhea. *Science*. **287**:491-495.
57. **Macejak, and D. G. a. O. Sarnow.** 1992. Association of heat shock protein with Enterovirus capsid precursor P1 in infected human cells. *Journal of Virology*. **66**:1520-1527.
58. **Mamelak, D., and a. L. Clifford.** 1997. Expression and sulfogalactolipid binding specificity of the recombinant testis-specific cognate heat shock protein 70. *Glycoconjugate journal*. **14**:715 - 722.
59. **Marsh, M., and A. & Helennius.** 1989. Virus entry into animal cells. *Avances in virus research*. **36**:107-151.
60. **Mendez, E., C. F. Arias, and S. Lopez.** 1993. Binding to sialic acids is not an essential step for the entry of animal rotaviruses to epithelial cells in culture. *J Virol*. **67**:5253-9.
61. **Mendez, E., C. F. Arias, and S. Lopez.** 1996. Interactions between the two surface proteins of rotavirus may alter the receptor-binding specificity of the virus. *J Virol*. **70**:1218-22.
62. **Mendez, E., S. López, M. A. Cuadras, P. Romero, and C. F. Arias.** 1999. Entry of rotaviruses is a multistep process. *Virology*. **263**:450-459.
63. **Moroianu, and J. W. F. Junona, James F Riordan, and Bert L. Vallee.** 1993. Actin is a surface component of calf pulmonary artery endothelial. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **90**:3815-3819.
64. **Multhoff, G., and a. L. E. Hightower.** 1996. Cell surface expression of heat shock proteins and the immune response. *Cell Stress & Chaperones*. **1**:167-176.
65. **Quan, C. M., and F. W. & Doane.** 1983. Ultrastructural evidence for the cellular uptake for rotavirus by endocytosis. *Intervirology*. **20**:223-231.
66. **Rocchi G., P. A., Ferrari C., Bolchi A., Manara G. C.** 1993. A New insight into the suggestion of a possible antigenic role of a member of the 70 kD heat shock proteins. *Cell Biology International*. **17**:83-92.

67. **Rodney E. Willoughby, and a. R. L. S. Robert H. Yolken.** 1990. Rotaviruses specifically bind to the neutral glycosphinglipid asialo-GM1. *Journal of Virology*. **64**:4830-4835.
68. **Rolsma, M. D., H. B. Gelberg, and M. S. Kuhlenschmidt.** 1994. Assay for evaluation of rotavirus-cell interactions: identification of an enterocyte ganglioside fraction that mediates group A porcine rotavirus recognition. *J Virol*. **68**:258-68.
69. **Sagara, J., and a. A. Kawai.** 1992. Identification of heat shock protein 70 in the rabies virion. *Virology*. **190**:845-848.
70. **Sainis, I., A. Ch., P. G., and L. I.** 1994. The hsc70 gene which is slightly induced by heat is the main virus inducible member of the hsp70 gene family. *FEBS Letters*. **355**:282-286.
71. **Schwartz, M. A., and M. H. G. Michael D. Schaller.** 1995. Integrins: emerging paradigms of signal transduction. *Annu Rev. Cell Dev. Biol*. **11**:549-599.
72. **Simons, K., and E. Ikonen.** 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature*. **387**:569-572.
73. **Smith J. W, D. J. V., Sally V. Irwin, Timothy A. Burke, and David A. Cheresch.** 1990. Purification and functional Characterization of Integrin $\alpha\text{v}\beta\text{5}$. *Journal Biological Chemistry*. **265**:11008- 11013.
74. **Smith J. W, R. S. P., and Danielle Mathis.** 1994. A mechanism for Divalent cation regulation of β3 -integrins. *The Journal of Biological chemistry*. **269**:960-967.
75. **Stefan, H. E. Kaufmann, and a. B. Schoel.** 1994. Heat shock proteins as antigens in immunity against infection and self. *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones*:495-531.
76. **Suto, R., and a. P. K. Srivastava.** 1995. A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned peptides. *Science*. **269**:1585-1588.
77. **Suzuki, H., S. Kitaoka, T. Konno, and T. Sato.** 1991. The localization and function of the neutralizing protein, VP4, in human rotavirus. *Tohoku J Exp Med*. **163**:73-5.
78. **Suzuki, H., S. Kitaoka, T. Konno, T. Sato, and N. Ishida.** 1985. Two modes of human rotavirus entry into MA 104 cells. *Arch Virol*. **85**:25-34.
79. **Suzuki, H., T. Sato, S. Kitaoka, F. Tazawa, T. Konno, Y. Amano, A. A. Alprecht, E. G. Vera, J. L. Villalta, Y. Numazaki, and a. I. et.** 1985. A human atypical rotavirus found in an Ecuador infant with diarrhea. *Tohoku J Exp Med*. **146**:481-2.
80. **Ugoloni Sophie, I. M. a. Q. J. S.** 1999. HIV-1 attachment: another look. *Trends in Microbiology*. **7**:144-149.

81. Vogel, and S.-J. I. Bruce E., Axel Hildebrand, William Craig, Michael D. Pierschbacher, Flossie Wong-Staal, and Erkki Ruoslahti. 1993. Novel integrin specificity exemplified by binding of the $\alpha v \beta 5$ integrin to the basic domain of the HIV Tat protein and vitronectin. *The Journal of Cell Biology*. **121**:461-468.
82. Wichman Tj, M. P., Cheresch DA, Nemerow GR. 1993. Integrins $\alpha v \beta 3$ and $\alpha v \beta 5$ promote Adenovirus Internalization but not virus attachment. *Cell*. **73**:309-319.
83. Xu Aimin, and R. B. a. J. A. Tylor. 1998. BiP (GRP78) and endoplasmin (GRP94) are induced following rotavirus infection and bind transiently to an endoplasmic reticulum-localized virion component. *Journal of Virology*. **72**:9865-9872.
84. 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.
85. Zárate, S., C. F. Arias, and S. López. 2000. $\alpha 2 \beta 1$ integrin mediates the cell attachment of the NA-resistant RRV variant nar3. Manuscript in preparation.
86. Zárate, S., R. Espinosa, P. Romero, E. Méndez, C. F. Arias, and S. López. 2000. The VP5 domain of VP4 can mediate the attachment of rotaviruses to cells. *J. Virol*. **74**:593-599.

ANEXO

El trabajo **“Early events of rotavirus infection: the search for the receptor(s)”** fue presentado por el Dr. Carlos Arias Ortiz en el simposio sobre virus que causan gastroenteritis, durante los días 16 - 18 de Mayo del 2000 realizado por la fundación Novartis en Londres, Inglaterra .

Early events of rotavirus infection: the search for the receptor(s)

Carlos F. Arias^{*}, Carlos A. Guerrero[†], Ernesto Méndez, Selene Zárate, Pavel Isa, Rafaela Espinosa, Pedro Romero, and Susana López

Departamento de Genética y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62250, Mexico

^{*}Corresponding author: Carlos F. Arias, Instituto de Biotecnología/UNAM, A.P. 510-3, Colonia Miraval, Cuernavaca, Morelos 62250, Mexico. Tel (52-73) 29-1661; Fax (52-73) 17-2388; e-mail: arias@ibt.unam.mx

[†]In academic leave from the Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia

Abstract

The entry of rotaviruses into epithelial cells seems to be a multistep process. Infection competition experiments have suggested that at least three different interactions between the virus and cell surface molecules take place during the early events of infection, and glycolipids as well as glycoproteins have been suggested to be primary attachment receptors for rotaviruses. The infectivity of some rotavirus strains depend on the presence of sialic acid on the cell surface, however, it has been shown that this interaction is not essential, and it has been suggested that there exists a neuraminidase-resistant cell surface molecule with which most rotaviruses interact. The comparative characterization of the sialic acid-dependent rotavirus strain RRV, its neuraminidase-resistant variant nar3, and the human rotavirus strain Wa has allowed to show that $\alpha 2\beta 1$ integrin is used by nar3 as its primary cell attachment site, and by RRV in a second interaction, subsequent to its initial contact with a sialic acid-containing cell receptor. We have also shown that integrin $\alpha V\beta 3$ and protein hsc70 are used by all three rotavirus strains as co-receptors, subsequent to their initial attachment to the cell. We propose that the functional rotavirus receptor is a complex of several cell molecules most likely immersed in glycosphingolipid-enriched plasma membrane microdomains.

Group A rotaviruses are nonenveloped viruses that possess a genome of 11 segments of double stranded RNA contained in a triple-layered protein capsid. The outermost layer is composed of two proteins, VP4 and VP7. The smooth external surface of the virus is made up of 780 copies of glycoprotein VP7, while 60 spike-like structures, formed by dimers of VP4, extend from the VP7 surface (Estes, 1996).

VP4 has essential functions in the virus life cycle, including receptor binding and cell penetration (Crawford *et al.*, 1994, López *et al.*, 1985, Ludert *et al.*, 1996). The properties of this protein are therefore important determinants of host range, virulence, and induction of protective immunity. The role of VP7 during the early interactions of the virus with the cell is not clear, although it has been shown that it can modulate some of the VP4-mediated virus phenotypes, including receptor binding (Beisner *et al.*, 1998, Méndez *et al.*, 1996), and it has been suggested that it might interact with cell surface molecules after the initial attachment of the virus through the spike protein (Coulson *et al.*, 1997, Estes, 1996, Méndez *et al.*, 1999). For rotaviruses to enter the cell, VP4 has to be cleaved by trypsin into two subunits, VP5 and VP8 (Arias *et al.*, 1996, López *et al.*, 1985).

Rotaviruses have a very specific cell tropism, infecting only the enterocytes on the tip of the intestinal villi, suggesting that specific host receptors must exist. *In vitro*, they also display a strict tropism, binding to a variety of cell lines, but infecting efficiently only those of renal or intestinal epithelium origin.

Different rotavirus strains display different requirements to bind, and thus infect, susceptible cells. The cell attachment of some rotavirus strains isolated from animals (other than humans) is greatly diminished by treatment of cells with neuraminidase (NA), indicating the need for sialic acid (SA) on the cell surface (Ciarlet & Estes, 1999, Fukudome *et al.*, 1989, Keljo & Smith, 1988, Méndez *et al.*, 1993). The interaction with a SA-containing receptor, however, does not seem to be essential, since variants which no longer need SA to infect the cells can be isolated from the SA-dependent strains (Ludert *et al.*, 1998, Méndez *et al.*, 1993). In addition, many animal rotavirus strains are NA-resistant and most, if not all, strains isolated from humans are also NA-resistant (Ciarlet & Estes, 1999, Fukudome *et al.*, 1989, Méndez *et al.*, 1999). Thus, there is a great interest in identifying the NA-resistant cellular receptor(s) for rotavirus, to determine the role it (they) may have on the narrow tropism observed for this virus. In this context, it is also of importance to define the viral proteins, and their specific domains, involved in contacting the cell receptor(s).

To understand the early events of rotavirus infection we have undertaken the comparative characterization of three rotavirus strains: the SA-dependent simian rotavirus RRV, its NA-resistant variant nar3, and the human rotavirus (HRV) strain Wa, which is naturally resistant to NA. A

summary of the advances and approaches we have taken to characterize the early events of infection of these viruses is presented.

The interaction of rotavirus with its host cell is a multistep process. Several lines of evidence suggest that rotaviruses need to interact with more than one cell surface molecule to enter the cell, using during this process different domains of the virus surface protein VP4 (Fig. 1). The following studies, which support these multiple interactions, were carried out in the rhesus monkey kidney epithelial cell line MA104, which is highly susceptible for rotavirus infection.

a) In an infection assay designed to detect competition for cell surface molecules at both attachment and post-attachment steps (Méndez *et al.*, 1999), it was found that HRV Wa efficiently competed the infectivity of the SA-dependent porcine rotavirus strain YM, and that of the variant nar3 both in untreated, as well as in NA-treated cells. This competition was nonreciprocal since YM and nar3 did not compete the infectivity of Wa. In contrast, a two-direction competition between the variant nar3 and a SA-dependent strain was found. The fact that the competition between the two NA-resistant strains nar3 and Wa was not reciprocal indicates that they bind to different molecules. In addition, the SA-dependence phenotype clearly differentiates strains, like RRV or YM, from nar3 and Wa. Altogether, these findings suggest the existence of at least three cellular structures involved in rotavirus cell infection, with at least one being shared by human, SA-dependent, and animal, NA-resistant, variant strains.

b) The comparison of the binding characteristics of wtRRV and nar3 to MA104 cells showed that both, the SA-dependent and SA-independent interactions of these viruses with the cell are mediated through two different domains of VP4 (Méndez *et al.*, 1993). It was shown that RRV attaches to the cell through VP8, while nar3 does so through the VP5 domain of VP4 (Zárate *et al.*, 2000b). This observation is supported by the fact that neutralizing antibodies to VP8 blocks the attachment to cells of RRV, but not of its variant nar3, while a MAb to VP5 (2G4) inhibits the binding of nar3, but not that of RRV. In addition, recombinant VP8 and VP5 proteins produced in bacteria as fusion products with GST, are capable of inhibiting the binding and infection of wt and variant viruses, respectively, when pre-incubated with the cell (Table I, Zárate *et al.*, 2000a). While nar3 only needs to interact (through VP5) with the NA-resistant receptor, wtRRV seems to engage in the two interactions described in a sequential manner, since MAb 2G4, despite of selectively blocking the binding of nar3, efficiently neutralizes the infectivity of both viruses (see also below).

c) The sequential interaction of RRV with two molecules on the surface of MA104 cells is further supported by the observation that MAb 2D9, which is directed to a cell surface antigen, specifically blocks the infectivity of both wtRRV and nar3, but competes only the attachment of the variant, indicating that wtRRV is blocked at a post-binding step (López *et al.*, 2000). Since MAb

2D9 also blocks the infectivity of nar3 in NA-treated cells, and it prevents the cell attachment of the recombinant protein GST-VP5, but does not affect the binding of GST-VP8 (Fig. 3), it would seem to be directed to the NA-resistant receptor used by nar3 to attach to the cell, or to a molecule closely associated to it.

Multiplicity of rotavirus receptors. Despite the advances in the molecular and structural biology of these viruses, little is known about the rotavirus cell receptors. A number of glycoconjugates have been shown to bind to, and to block the infectivity of, SA-dependent animal rotavirus strains, and some of them have been suggested to play a role as possible receptors, like GM3 gangliosides in newborn piglet intestine (Rolsma *et al.*, 1998), GM1 in LLC-MK2 cells (Superti & Donelli, 1991), and 300-330 kDa glycoproteins in murine enterocytes (Bass *et al.*, 1991). It has also been suggested that the NA-resistant ganglioside GM1 may act as a receptor for some HRV strains in MA104 cells (Guo *et al.*, 1999). Recently, it was reported that VP4 contains the DGE and IDA tripeptide sequence motifs known to interact with integrins $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha 4\beta 1$, respectively, while VP7 contains the $\alpha X\beta 2$ integrin ligand site GPR, and the $\alpha 4\beta 1$ binding motif LDV (Coulson *et al.*, 1997, Hewish *et al.*, 2000). Antibodies to the integrin subunits $\alpha 2$, $\beta 2$, and $\alpha 4$, as well as peptides that mimic the ligand sites were shown to block the infectivity of the SA-dependent rotavirus SA11 and the HRV strain RV5 (Coulson *et al.*, 1997), and it was also shown that integrins $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha 4\beta 1$ can mediate the attachment and entry of rotavirus SA11 into the human myelogenous leukemic cell line K562 (Hewish *et al.*, 2000).

As part of the biochemical characterization of the rotavirus cell receptors, we have recently shown that the infectivity of rotaviruses RRV, nar3, and Wa is partially blocked by metabolic inhibitors of N-glycosylation (tunicamycin), and glycolipid synthesis (PDMP), while it is not affected by the inhibition of the cellular O-glycosylation (Guerrero *et al.*, 2000b). In addition, we also showed that sequestration of cholesterol from the cell membrane with methyl- β -cyclodextrin reduced the infectivity of the three viruses by more than 90%, while not affecting their binding to the cell (Table II). The involvement of N-glycosylated proteins, glycolipids, and cholesterol in rotavirus infection suggest that the virus receptor(s) might be forming part of the cell membrane glycosphingolipid-enriched lipid microdomains, termed rafts (Simons & Ikonen, 1997).

In a different approach we showed that treatment of MA104 cells with the non-ionic detergent β -octylglucoside (OG), under non-lytic conditions, renders the cells largely refractory to binding and infection by rotaviruses (Table II) (Guerrero *et al.*, 2000b), most probably due to the extraction of the rotavirus receptor(s). Accordingly, pre-incubation of the viruses with the OG

extract inhibited infectivity by more than 95% (Fig. 2). Five protein bands with the ability to block rotavirus infectivity were purified by preparative electrophoresis from these extracts, and amino acid sequence analysis of two of these bands, of 72 and 110 kDa, revealed the presence, among other proteins, of the heat shock cognate protein (hsc70) and of the $\beta 3$ integrin subunit, respectively.

$\alpha 2\beta 1$ integrin mediates the cell attachment of the NA-resistant RRV variant nar3.

The initial interaction of nar3 with the cell surface is likely to be with integrin $\alpha 2\beta 1$, through the DGE integrin binding domain present in VP5, since: i) antibodies to the $\alpha 2$ subunit reduce by 30% the infectivity of both wt RRV and nar3, but only block the cell attachment of nar3; ii) MAbs to $\alpha 2$ block the attachment of the GST-VP5 fusion protein but not that of GST-VP8 (Fig. 3); iii) GST-VP5 specifically displaces up to 75% of the cell binding of nar3, while a GST-VP5 mutant polypeptide in which the $\alpha 2$ integrin binding motif DGE was changed to AGE no longer displaces it; and iv) a synthetic VP4 peptide which comprises the $\alpha 2\beta 1$ integrin binding motif DGE efficiently inhibits the attachment of nar3, but not that of RRV (Fig. 3) (Zárate *et al.*, 2000a).

Even though the behavior of MAb 2D9 is similar to that of $\alpha 2\beta 1$ integrin antibodies (Fig. 3), 2D9 is probably not directed to this integrin, since its pattern of staining of mouse small intestinal cells is quite different from that obtained with $\alpha 2\beta 1$ MAbs (unpublished data). Nevertheless, the cell structure recognized by 2D9 must be in close proximity to integrin $\alpha 2\beta 1$ on the surface of MA104 cells, since MAb 2D9 displaces the binding of antibodies to $\alpha 2\beta 1$ by flow cytometry (Zárate *et al.*, 2000a). 2D9 might serve as an alternative cell receptor for the variant nar3, since cells that lack $\alpha 2\beta 1$ but are 2D9-positive, like L or CHO, can be infected by this virus, albeit at much lower efficiency (unpublished data).

Integrin $\beta 3$ functions as a co-receptor for rotaviruses. The relevance of $\beta 3$ integrin for rotavirus infection was established by the fact that antibodies to this integrin subunit reduced by 50% the infectivity of RRV, nar3 and Wa rotaviruses. In accordance to this finding, when vitronectin, a $\beta 3$ integrin ligand, was pre-incubated with the cell, it specifically blocked rotavirus infectivity up to 70 % (Guerrero *et al.*, 2000c).

Since integrins $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, and $\alpha X\beta 2$ have been suggested to play a role during rotavirus entry (Coulson *et al.*, 1997), we performed blocking experiments using mixes of antibodies directed to these integrins and to $\alpha V\beta 3$. A clear additive blocking effect was found when antibodies to integrins $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha V\beta 3$ were mixed, suggesting that these two integrins might be involved in different stages of rotavirus infection (Guerrero *et al.*, 2000c).

The expression of $\beta 3$ integrin into the poorly permissive CHO cells was shown to facilitate the infectivity of rotaviruses. We found that CHO cells stably transfected with the $\beta 3$ integrin gene (Díaz-González *et al.*, 1996), overexpressing either $\alpha IIb\beta 3$ and $\alpha V\beta 3$ integrins, were three to four times more susceptible to rotavirus infection than the parental CHO cell line. This increase in infectivity was shown to be blocked by incubation of the cells with either MAbs to $\beta 3$ or vitronectin (Fig. 4) (Guerrero *et al.*, 2000c). Furthermore, it was shown that the interaction of rotaviruses with $\alpha V\beta 3$ is at a post-attachment step, probably penetration, since vitronectin and antibodies to $\beta 3$ do not, or only slightly, inhibit rotavirus cell attachment. Also, the interaction of rotaviruses with $\beta 3$ integrin was found to be RGD-independent, as expected from the fact that neither VP4 nor VP7 have this integrin binding motif (Guerrero *et al.*, 2000c).

Hsc70 mediates rotavirus infectivity. From the MA104 cell proteins extracted with OG, the band of 72 kDa, which was identified as hsc70, had the highest blocking activity for all three rotavirus strains tested. Hsc70 is a constitutive member of the stress-inducible hsp70 protein family, which functions in normal cellular physiology. The hsp70 proteins are a family of highly conserved proteins associated to a number of functions, including protein folding, translocation across biological membranes, and assembly and disassembly of oligomeric complexes (Hartl, 1996).

Despite the fact that hsc70 has no export signal sequence, it has been shown that it can be exposed in the surface of various cell types (Multhoff & Hightower, 1996). The presence of this protein on the surface of MA104 cells was demonstrated by flow cytometry and immunofluorescence of non-permeabilized cells (Fig. 5) (Guerrero *et al.*, 2000a).

To evaluate the role of this protein during rotavirus entry, MAbs to hsc70 were tested for their ability to block infectivity. When pre-incubated with the cell, these MAbs specifically blocked the infectivity of rotaviruses RRV, nar3 and Wa by about 80%. Despite this efficient blocking activity, the MAbs to hsc70 did not prevent virus cell attachment, indicating that they interfere with

the virus infectivity at a post-binding step. In support of this observation is the fact that if recombinant human hsc70 protein is added to the viruses after they had been adsorbed to the cell at 4°C, the inhibition of virus infectivity is higher than 90% (versus 40-50% inhibition if the protein is incubated with the viruses before infection), indicating that the protein can interact more efficiently with the viruses when they are already bound to cells (Guerrero *et al.*, 2000a). These data suggest that hsc70 protein is involved in rotavirus entry to MA104 cells, although its precise role has yet to be determined.

A model for the early interactions of rotaviruses with MA104 cells. As a summary of the data presented here, we propose the following working model (Fig. 6), which takes into account the currently available information:

→ Wild type RRV interacts primarily with a SA-containing cell receptor through the VP8 domain of VP4. The identity of the SA-containing molecule has not been determined, although good candidates are ganglioside GM3 (Guo *et al.*, 1999, Rolsma *et al.*, 1998), or the SA present in the integrin molecules (see below). The SA-binding domain of VP8 is located between amino acids 93 to 208, with residues 155, and 188 to 190, having an important role in this function (Fig. 1) (Fiore *et al.*, 1991, Fuentes Panana *et al.*, 1995, Isa *et al.*, 1997).

→ Subsequent to the initial interaction with SA, RRV interacts with a second cell receptor, most probably $\alpha 2\beta 1$ integrin, through the DGE integrin-binding motif located in the VP5 subunit of VP4 (Zárate *et al.*, 2000a). The ability of the NA-resistant variant nar3 to interact directly with this integrin is likely to be the result of a slight different conformation of its VP4 protein, compared to that of the wtRRV protein (Méndez *et al.*, 1993, Méndez *et al.*, 1996).

Although the present data clearly indicate the existence of two different interactions between wt RRV and the cell surface, it has not yet been established whether two cell molecules, or two sites in the same molecule (e.g. $\alpha 2\beta 1$), interact with VP8 and VP5. The fact that in infection competition assays the wt and variant viruses compete with each other reciprocally, suggests that if it is not the same cellular entity, the two cell molecules must be in close proximity.

→ Integrins $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha X\beta 2$ have been implicated in rotavirus cell infection (Coulson *et al.*, 1997, Guerrero *et al.*, 2000c, Hewish *et al.*, 2000). The role of these integrins has not been determined yet, however, given that not additivity was observed when mixes of antibodies to these and other integrins were tested, they may represent alternative interaction sites for rotaviruses.

→ The results obtained in the infection competition assay described above suggest that HRV Wa initially attaches to a cell surface molecule that is used by RRV and nar3, in a subsequent step after their interaction with $\alpha 2\beta 1$ integrin. It can not be ruled out, however, that the attachment

receptor for Wa is not actually used by RRV and nar3, but that HRV Wa interferes with the infectivity of these viruses by binding to a molecule that might be located in close proximity to either $\alpha 2\beta 1$, or to co-receptors $\alpha V\beta 3$ and hsc70. The cellular molecule used by HRV Wa to bind to cells, and the viral protein domains responsible for this interaction have not been yet characterized.

→ We have found that hsc70 and integrin $\alpha V\beta 3$ play important roles for infection of all three rotavirus strains at a post-attachment step, most likely penetration, however the precise function of these proteins has to be characterized.

→ The essential components of the glycosphingolipid-enriched membrane domains, termed rafts, are glycoproteins, glycosphingolipids, and cholesterol. Since these three components have been found to be important for the initial steps of rotavirus infection (Guerrero *et al.*, 2000b); and $\alpha 2\beta 1$, $\alpha V\beta 3$, and hsc70 proteins have been observed to be present in rafts (unpublished data, and Green *et al.*, 1999), we propose that some or all of the various virus-cell interactions described above might take place in these lipid microdomains.

The data presented here is consistent with the existence of several rotavirus receptors which might be tightly organized, maybe forming a complex in glycosphingolipid-enriched rafts. The requirement for several cell molecules which need to be present and organized in a precise fashion, might explain the exquisite cell and tissue tropism of these viruses. It remains to be established which, if any, of the receptor molecules described so far is indeed non replaceable, and if in fact there exists a unique pathway of infectivity for rotaviruses, with distinct entry points for different strains.

In conclusion, much remains to be learned about the process of binding and penetration of rotaviruses. The characterization of the nature of the interactions that occur between the cellular and viral partners, and the signal transduction pathways potentially triggered by the early virus-cell contacts, should give insight into the elaborated mechanism used by these viruses to enter cells.

Acknowledgments

This work was partially supported by grants 75197-527106 from the Howard Hughes Medical Institute, G0012-N9607 from the National Council for Science and Technology-Mexico, and IN201399 from DGAPA-UNAM.

References

- Arias CF, Romero P, Alvarez V, Lopez S 1996 Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity. *J Virol* 70:5832-5839
- Bass DM, Mackow ER, Greenberg HB 1991 Identification and partial characterization of a rhesus rotavirus binding glycoprotein on murine enterocytes. *Virology* 183:602-610
- Beisner B, Kool D, Marich A, Holmes IH 1998 Characterisation of G serotype dependent non-antibody inhibitors of rotavirus in normal mouse serum. *Arch Virol* 143:1277-1294
- Ciarlet M, Estes MK 1999 Human and most animal rotavirus strains do not require the presence of sialic acid on the cell surface for efficient infectivity. *J Gen Virol* 80:943-948
- Coulson BS, Londrigan SL, Lee DJ 1997 Rotavirus contains integrin ligand sequences and a disintegrin-like domain that are implicated in virus entry into cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:5389-5394
- Crawford SE, Labbe M, Cohen J, Burroughs MH, Zhou YJ, Estes MK 1994 Characterization of virus-like particles produced by the expression of rotavirus capsid proteins in insect cells. *J Virol* 68:5945-5922
- Díaz-González F, Forsyth J, Steiner B, Ginsberg MH 1996 Trans-dominant inhibition of integrin function. *Mol Biol Cell* 7:1939-1951
- Estes MK 1996 Rotaviruses and their replication. In *Virology*, pp. 1625-1655. Ed by BN Fields et al New York: Raven Press.
- Fiore L, Greenberg HB, Mackow ER 1991 The VP8 fragment of VP4 is the rhesus rotavirus hemagglutinin. *Virology* 181:553-563
- Fuentes-Panana EM, López S, Gorziglia M, Arias CF 1995 Mapping the hemagglutination domain of rotaviruses. *J Virol* 6: 2629-2632
- Fukudome K, Yoshie O, Konno T 1989 Comparison of human, simian, and bovine rotaviruses for requirement of sialic acid in hemagglutination and cell adsorption. *Virology* 172:196-205
- Green JM, Zhelesnyak A, Chung J, Lindberg JP, Sarfati M, Frazier WA, Brown EJ 1999 Role of cholesterol in formation and function of a signaling complex involving α V β 3, integrin-associated protein (CD47), and heterotrimeric G proteins. *J Cell Biol* 146:673-682
- Guerrero CA, Méndez E, Zárate S, Isa P, López S, Arias CF 2000a The hsc70 protein is involved in rotavirus cell entry. Manuscript in preparation
- Guerrero CA, Zárate S, Corkidi G, López S, Arias CF 2000b Biochemical characterization of rotavirus receptors in MA104 cells. *J Virol* Submitted
- Guerrero CA, Zárate S, Isa P, Méndez E, López S, Arias CF 2000c Integrin α V β 3 is a co-receptor for rotavirus infection. Submitted

- Guo C, Nakagomi O, Mochizuki M, Ishida H, Kiso M, Ohta Y, Suzuki T, Miyamoto D, Jwa KI, Suzuki Y 1999 Ganglioside GM1a on the cell surface is involved in the infection by human rotavirus KUN and MO strains1. *J Biochem (Tokyo)* 126: 683-688
- Hartl FU 1996 Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381:571-580
- Hewish MJ, Takada Y, Coulson BS 2000 Integrins $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha 4\beta 1$ can mediate SA11 rotavirus attachment and entry into cells. *J Virol* 74:228-236
- Isa P, López S, Segovia L, Arias CF 1997 Functional and structural analysis of the sialic acid-binding domain of rotaviruses. *J Virol* 71:6749-6756
- Keljo DJ, Smith AK 1988 Characterization of binding of simian rotavirus SA-11 to cultured epithelial cells. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 7:249-256
- López S, Arias CF, Bell JR, Strauss JH, Espejo RT 1985 Primary structure of the cleavage site associated with trypsin enhancement of rotavirus SA11 infectivity. *Virology* 144:11-19
- López S, Espinosa R, Isa P, Zárate S, Méndez E, Arias CF 2000 Characterization of a monoclonal antibody directed to the surface of MA104 cells that blocks the infectivity of rotaviruses. *Virology*. Submitted
- Ludert JE, Feng N, Yu JH, Broome RL, Hoshino Y, Greenberg HB 1996 Genetic mapping indicates that VP4 is the rotavirus cell attachment protein in vitro and in vivo. *J Virol* 70:487-493
- Ludert JE, Mason BB, Angel J, Tang B, Hoshino Y, Feng N, Vo PT, Mackow EM, Ruggeri FM, Greenberg HB 1998 Identification of mutations in the rotavirus protein VP4 that alter sialic-acid-dependent infection. *J Gen Virol* 79:725-729
- Méndez E, Arias CF, López S 1993 Binding to sialic acids is not an essential step for the entry of animal rotaviruses to epithelial cells in culture. *J Virol* 67:5253-5259
- Méndez E, Arias CF, López S 1996 Interactions between the two surface proteins of rotavirus may alter the receptor-binding specificity of the virus. *J Virol* 70:1218-1222
- Méndez E, Lopez S, Cuadras MA, Romero P, Arias CF 1999 Entry of rotaviruses is a multistep process. *Virology* 263:450-459
- Multhoff G, Hightower LE 1996 Cell surface expression of heat shock proteins and the immune response. *Cell Stress Chap* 1:167-176
- Rolsma MD, Kuhlenschmidt TB, Gelberg HB, Kuhlenschmidt MS 1998 Structure and function of a ganglioside receptor for porcine rotavirus. *J Virol* 72:9079-9091
- Simons K, Ikonen E 1997 Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387:569-572
- Superti F, Donelli G 1991 Gangliosides as binding sites in SA-11 rotavirus infection of LLC-MK2 cells. *J Gen Virol* 72:2467-2474
- Zárate S, Arias CF, López S 2000a $\alpha 2\beta 1$ integrin mediates the cell attachment of the NA-resistant RRV variant nar3. Manuscript in preparation

Zárate S, Espinosa R, Romero P, Méndez E, Arias CF, Lopez S 2000b The VP5 domain of VP4 can mediate attachment of rotaviruses to cells. *J Virol* 74:593-599.

Figure legends

Fig. 1 Distinctive structural features of the outer shell protein VP4. The trypsin cleavage region is indicated by an arrow, which defines the boundary between VP8 and VP5. In VP8, the hemagglutination domain (HA) (aa 93 to-208) is shadowed; the asterisks below this domain indicate aa 155, and 188 to 190, which are important in the SA binding activity of this protein. The disulfide bridges between Cys 203 and Cys 216, and between Cys 318 and Cys 380, are indicated by S=S. In VP5, the position of the DGE and IDA tripeptide sequence binding motifs which might putatively be recognized by integrins $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha 4\beta 1$, respectively, are shown. The hydrophobic region (HR), which has been proposed to be a putative fusion domain, and a predicted heptad repeat (coiled-coil) which might form part of a coiled-coil structure are also depicted.

Fig. 2. Inhibition of rotavirus infectivity by the OG extract. The indicated concentrations of OG-extracted protein were incubated with the viruses for 90 min at 37°C. The virus-protein mixtures were used to infect MA104 cell monolayers, after an adsorption period at 4°C, the inoculum was removed and the infection was left to proceed for 14h at 37°C. At this time the cells were fixed, and the infectious titer was determined by an immunoperoxidase focus assay. Percent infectivity is referred to the infectivity of the viruses incubated in 0.2% OG. Error bars represent one standard error of the mean of three independent experiments carried out in duplicate.

Fig. 3.- Effect of antibodies to the cell surface, and of a VP4 peptide, on the binding of RRV and nar3 viruses. Purified RRV or nar3 viral particles or affinity purified GST-VP8 and GST-VP5 fusion protein were preincubated with the indicated MAbs or with the synthetic peptide. After incubation, the virus or protein mixtures were added to a suspension of MA104 cells, and incubated with gentle shaking. The amount of cell bound virus, or fusion protein, was determined by an ELISA, as described (Zárate et al, 2000b). A MAb to the integrin subunit $\alpha 2$ ($\alpha 2$ MAb), and a MAb directed to an unknown antigen on the cell surface (2D9 MAb) were tested. The VP4 synthetic peptide evaluated comprises amino acid residues 300 to 321 of the protein, and contains the DGE sequence binding motif for integrin $\alpha 2\beta 1$. Data are expressed as the percentage of virus or recombinant protein binding, in the absence of antibodies or peptide. The arithmetic means and standard deviations of two independent experiments are shown.

Fig. 4.- The expression of $\beta 3$ integrin in CHO cells facilitates rotavirus cell infection. Monolayers of control CHO cells or CHO cells expressing integrin $\alpha IIb\beta 3$ (Díaz-González *et al.*, 1996), in 96-well plates, were infected with 2×10^3 ffu's of RRV, nar3 or Wa viruses per well. After 60 min adsorption at 37°C , the infection was left to proceed for 16 h at 37°C , time at which the cells were fixed and immunostained. In the condition where the cells were preincubated with vitronectin (CHO/ $\alpha IIb\beta 3$ + Vn), the integrin ligand ($1.5 \mu\text{g/ml}$) was added for 1h at 37°C before virus infection. Data are expressed as percentage of the virus infectivity obtained in the CHO cells. The arithmetic mean from two independent experiments performed in duplicate are shown. The standard error is shown.

Fig. 5.- The heat shock cognate protein 70 (hsc70) is present on the surface of cells. Non permeabilized MA104 cells, fixed with paraformaldehyde, were incubated with MAb MA-014 to hsc70 (left panel), or with a control IgM antibody (right panel), and the cells were then stained with goat anti-mouse IgM antibodies conjugated to fluorescein-isothiocyanate.

Fig. 6.- A model for the early interactions of rotaviruses with MA104 cells. Wild type RRV interacts primarily with a SA-containing cell receptor through the VP8 domain of VP4. Subsequent to this initial interaction, which might induce a conformational change in VP4, the virus interacts with a second, NA-resistant cell receptor, here proposed to be $\alpha 2\beta 1$ integrin. This interaction is through the DGE binding motif of VP5, present at aa 308-310. This second virus-cell interaction might facilitate a third interaction of the virus with $\beta 3$ integrin and/or hsc70. The SA-independent variant nar3 is proposed to interact directly, through VP5, with the $\alpha 2\beta 1$ integrin. For the sake of clarity, the SA-containing and NA-resistant cellular receptors are depicted here as two separate entities, however, they could be two domains of the same receptor molecule (see text). The nature of the attachment site for the HRV strain Wa has not been determined, however, we propose that it binds to a molecule that is in close proximity to $\alpha 2\beta 1$ (see text). The antigen recognized by MAb 2D9 (2D9-Ag) has not been identified, but we assume that it should also be close to the $\alpha 2\beta 1$ integrin (see text). After their initial contact with the cell, all three rotavirus strains are proposed to interact with $\beta 3$ integrin and/or hsc70, interaction that might mediate the penetration of the viruses into the cell's interior. In this model most, if not all, of the molecules involved in rotavirus binding and entry are proposed to form a complex, probably embedded in glycosphingolipid-enriched lipid microdomains on the cell surface.

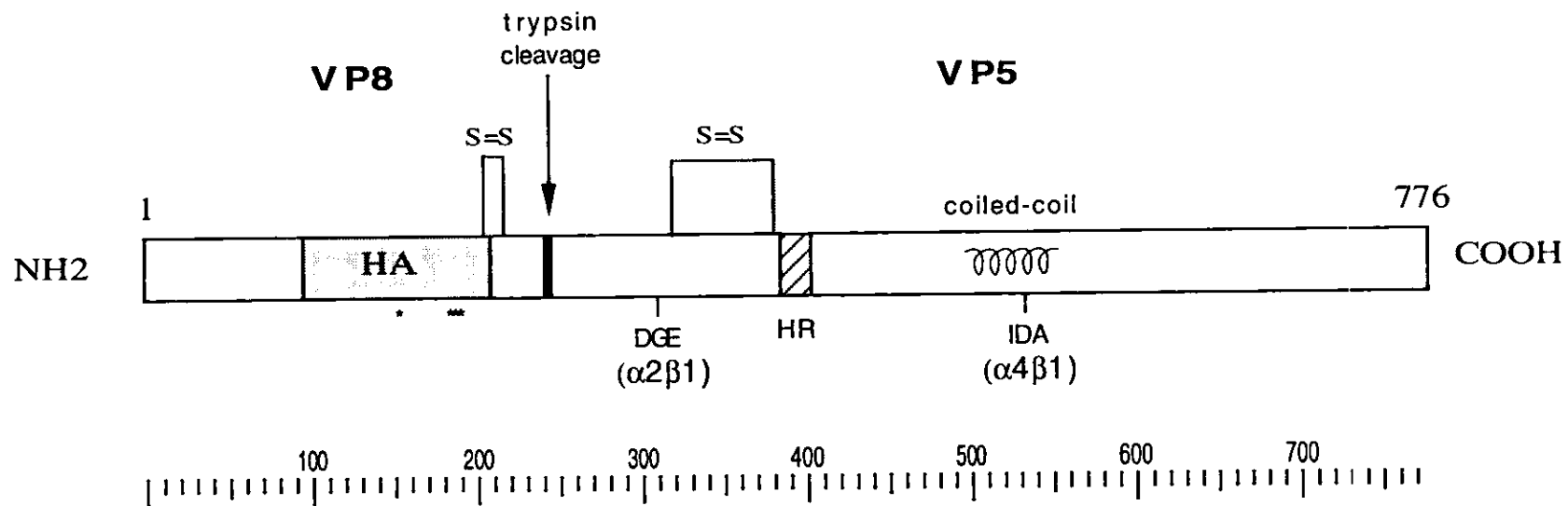


Fig. 1

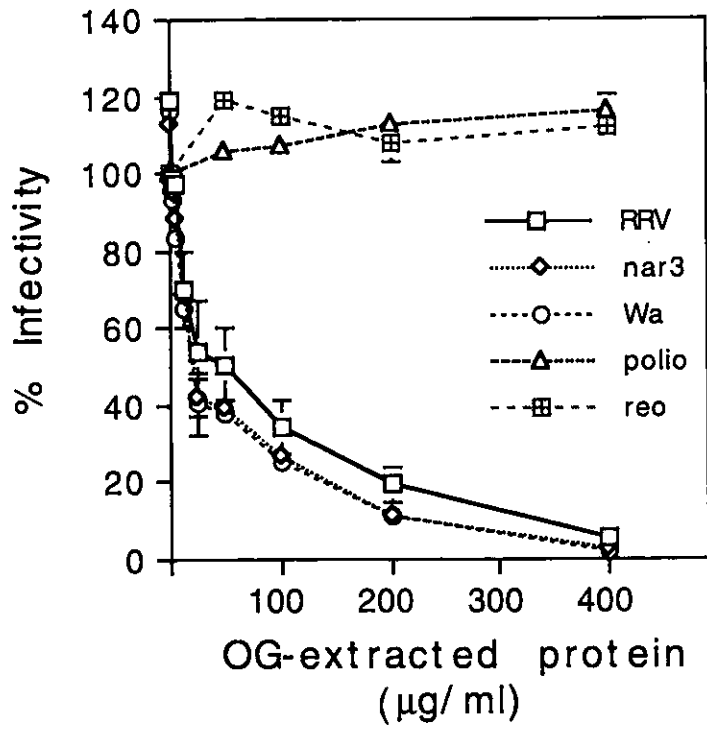


Fig. 2

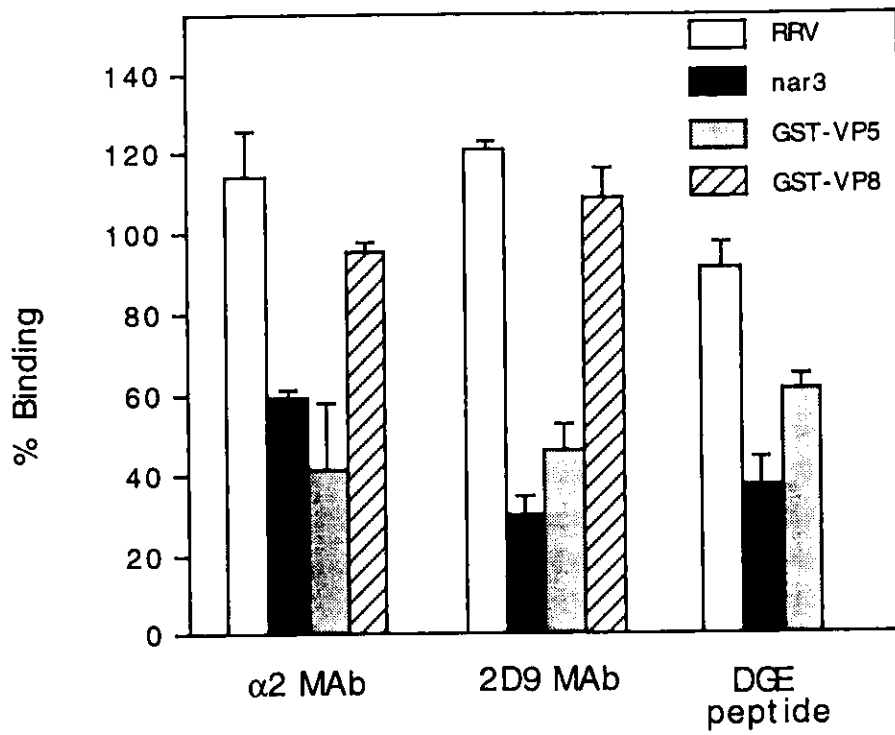


Fig. 3

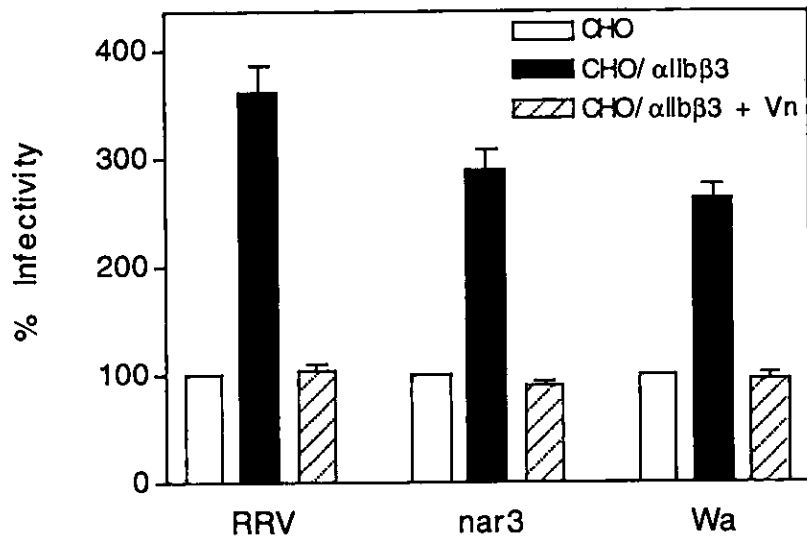


Fig. 4

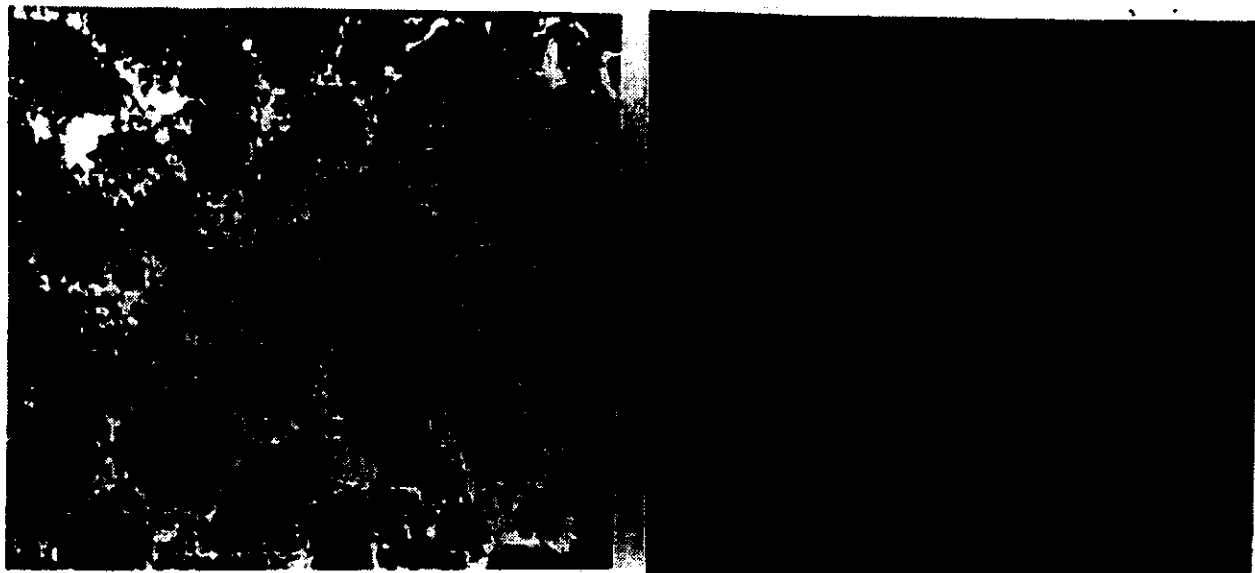
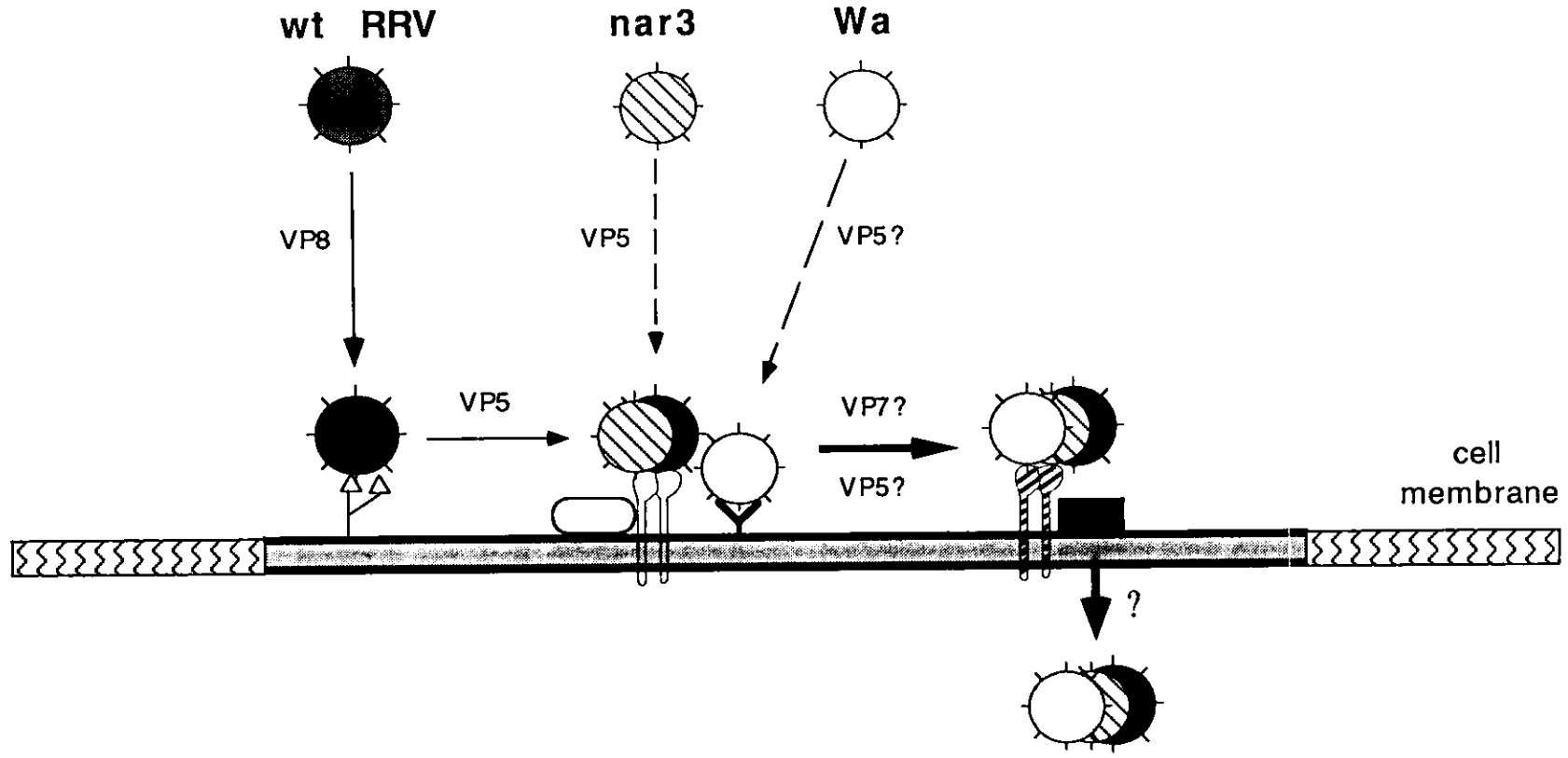


Fig. 5



▲▲ SA-containing receptor
○ 2D9-Ag
||| α2β1 integrin
||| αVβ3 integrin
Y Wa receptor
■ hsc70
▨ lipid raft in the cell membrane

Fig. 6

Table 1. Inhibition of binding and infectivity of RRV and nar3 viruses by MAbs to VP4 and by VP8 and VP5 recombinant proteins

Virus	% Binding and infectivity in the presence of the indicated MAbs or recombinant proteins					
	no MAb	α VP8 (7A12)	α VP5 (2G4)	GST	GST-VP8	GST-VP5
Binding^a						
RRV	100	9	84	102	25	97
nar3	100	72	9	99	100	24
Infectivity^b						
RRV	100	8	9	87	44	102
nar3	100	20	16	110	104	50

^aExpressed as the percentage of virus binding in the absence of antibodies or recombinant proteins.

^bExpressed as percentage of the virus infectivity obtained in the absence of antibodies or recombinant proteins. The arithmetic means from two independent experiments performed in duplicate are shown.

Table 2. Effect of metabolic inhibitors, cell membrane cholesterol depletion, and octyl- β -glucoside on the infectivity and binding of rotaviruses in MA104 cells.

Inhibitor ^a	% Infectivity			% Binding		
	RRV	nar3	Wa	RRV	nar3	Wa
No treatment	100	100	100	100	100	100
PDMP (25 μ g/ml)	20	40	23	110	46	104
Tunicamycin (2 μ g/ml)	56	48	---	111	101	94
BenzylGalNAc (2 mM)	101	150	147	ND	ND	ND
Octyl- β -glucoside (0.2%)	41	41	39	32	40	33
β -cyclodextrin (1 mM)	9	6	5	112	109	116
OG extract ^b	5	3	4	60	59	57

^aMA104 cell monolayers were incubated with the indicated concentration of inhibitor for 1 h (β -cyclodextrin), 24 h (tunicamycin), or 72 h (PDMP, and BenzylGalNAc) at 37°C, or for 90 min (octyl- β -glucoside) at room temperature, before virus infection.

^bRotaviruses were incubated with either 20 or 400 μ g/ml of OG-extracted proteins, for the binding and infectivity inhibition assays, respectively. At 20 μ g/ml, the infectivity of all three viruses was inhibited by about 40%. The mean of at least three independent experiments carried out in duplicate is shown.