

UCH - FC
DOC - Microbiología
V 335
c-1

**“Rol del motivo *tipo-HIT* en la hidrólisis de los NTPs
por la proteína no estructural 2 (NSP2) de rotavirus”**

**Tesis entregada en la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Microbiología.**

Facultad de Ciencias.

por

Rodrigo Vasquez Del Carpio.



Octubre, 2004.

Directores: Dr. Eugenio Spencer y Dr. John T. Patton

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS



INFORME DE APROBACIÓN

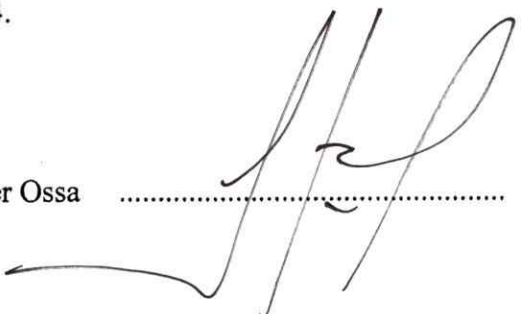
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la tesis de Doctorado presentada por el candidato:

RODRIGO VASQUEZ DEL CARPIO

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Microbiología, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día Lunes 25 de Octubre de 2004.

Director de Tesis:

Dr. Eugenio Spencer Ossa 

Co-Director de Tesis:

Dr. John T. Patton

Comisión de Evaluación de Tesis:

Dr. Romilio Espejo 

Dr. Oscar León 

Dr. Víctor Cifuentes 



AGRADECIMIENTOS

A mi Madre, que a través de los años de mi vida forjo en mí la metodología, ideología y disciplina de estudio, me dio tanto coraje como ternura, así como también muchos y muy buenos consejos de vida diaria y convivencia. Gracias Madre, tú me ayudaste mucho en esto.

A Ine, que impulsó y fortaleció ese interés en la ciencia que mostré desde tempranos momentos en mi infancia. Gracias por brindarme siempre tu apoyo incondicional.

A Marcelo, que me escuchó durante los buenos y malos momentos. Gracias por tu apoyo y los sabios consejos que me diste.

A mis hermanos, que mediante su apoyo hicieron de esta jornada una experiencia mucho mas llevadera. Gracias por depositar su fe en mí.

A Eugenio, mi tutor, gracias por enseñarme la simpleza en las situaciones difíciles y apretarme el cuello cuando lo necesitaba. Gracias por confiar en mi persona y ofrecerme todas las oportunidades que me diste.

A John, mi co-tutor, gracias por recibirme en ese espléndido laboratorio, darme oportunidades y exigirme seriedad. Gracias por ver en mí una persona adecuada para desarrollar un trabajo tan exigente como es el de la ciencia.

A Zenobia Taraporewala, gracias por enseñarme el trabajo minucioso y meticuloso que es requerido para una buena publicación. El aporte tuyo en la realización de mi tesis fue fundamental, tanto por el consejo en el diseño de los experimentos como



en la técnica y realización de estos. Tu aporte en la realización y diseño de la parte ~~teórica~~ fue invaluable.

A Danilo González, gracias por enseñarme ese mundo que es la simulación molecular. El aporte que otorgo la utilización de esta estrategia computacional fue sumamente importante, proveyó de un giro singular y vistoso a la tesis. Tu aporte en la realización de la parte computacional de mi tesis fue fundamental. Te agradezco por esas largas horas sentadas frente al computador.

A Mario Barro, gracias por llevarme a ese maravilloso lugar de trabajo que es el laboratorio de Virología en la Universidad de Santiago de Chile. Te agradezco por ver en mi alguien adecuado para el laboratorio e introducirme al mundo de la virología.

A Jonas Chnaiderman, gracias por la diversa ayuda que me brindaste a través de mi tesis, tanto consejos en la realización de experimentos como consejos personales.

A Maria Teresa Castillo, gracias por tu magnifico aporte técnico. Te agradezco mucho la agradable compañía que me brindaste en esas largas horas de espera durante los experimentos.

Agradezco también a las personas que estuvieron conmigo en alguna etapa de mi tesis y me ayudaron en diversos aspectos. Gracias a Oscar Valderrama, Claudia Bravo, Suany Ojeda, Raquel Quatrini, Jaime Morales, Alberto Manchego, Maria Magdalena Montt, Tamara Bar-Magen, Jorge Allende, Emilio Cardemil, Hari Jayaram, B.V.V Prasad, Dayue Chen, Lynn Silvestri y Alejandra Tortorici.

Agradezco a los profesores que conforman la comisión evaluadora de mi tesis de doctorado, aprecio el tiempo que ellos dieron para revisar y evaluar la tesis.

Agradezco a las dos instituciones que financiaron mis estudios en tiempos distintos. El aporte económico del DAAD y de Conicyt en la realización del doctorado fue indispensable.

Finalmente agradezco al National Institutes of Health (NIH) de Estados Unidos, el aporte brindado por esa gran institución para la realización de la tesis en términos de infraestructura, servicios y materiales fue fundamental.



INDICE

	Pag.
1. ABREVIATURAS	7
2. RESUMEN	8
3. SUMMARY	10
4. INTRODUCCIÓN	12
4.1. Generalidades.	12
4.2. Estructura del virion.	13
4.3. Ciclo Infeccioso.	16
4.4. Proteínas no estructurales 1, 3, 4 y 6.	21
4.5. Proteínas no estructurales 2 y 5.	22
4.6. Antecedentes del presente trabajo.	25
5. HIPOTESIS Y OBJETIVOS	33
6. MATERIALES Y METODOS	34
6.1. Cultivo Celular y propagación viral.	34
6.2. Vectores de expresión y modificación sitio-dirigida.	34
6.3. Expresión y purificación de NSP2 y NSP5 recombinantes.	37
6.4. Centrifugación zonal.	38
6.5. Ensayos de hidrólisis de ATP.	38
6.6. Ensayos de fotoentrecruzamiento.	39
6.7. Ensayos de fosforilación <i>in vitro</i> de NSP2 y NSP5.	40
6.8. Estabilidad del enlace fosfoaminoácido en NSP2 bajo condiciones ácidas o alcalinas.	40

6.9.	Ensayos de unión a RNA.	41
6.10.	Ensayos de expresión transiente <i>in vivo</i> de NSP2 y NSP5.	42
6.11.	Inmunofluorescencia.	42
6.12.	Marcación radioactiva de NSP2 y NSP5 <i>in vivo</i> .	43
6.13.	Simulación molecular.	44
6.14.	Secuencias de NSP2 utilizadas en el alineamiento.	45
7.	RESULTADOS	47
7.1.	Motivo <i>tipo-HIT</i> en NSP2.	47
7.2.	Selección de los residuos para la modificación sitio-dirigida en NSP2.	50
7.3.	Los residuos E153, Y171, K188, H221, H225 y R227 son críticos para la actividad NTPasa.	51
7.4.	Modelación y simulación de la unión de la molécula de ATP en NSP2.	53
7.5.	Unión del ATP a la proteína NSP2.	59
7.6.	Requerimiento del ion Mg^{2+} para la unión e hidrólisis del ATP.	62
7.7.	Hidrólisis del ATP y autofosforilación de NSP2.	63
7.8.	Cinética de hidrólisis del ATP y de autofosforilación.	66
7.9.	Estabilidad del intermediario fosforilado en NSP2.	70
7.10.	Hidrólisis del ATP e interacción RNA-proteína en NSP2.	74
7.11.	Hidrólisis del ATP y fosforilación <i>in vitro</i> de NSP5.	75
7.12.	Hidrólisis del ATP y fosforilación <i>in vivo</i> de NSP5.	79
7.13.	Hidrólisis del ATP y formación de estructuras tipo-viroplasma.	81

8. DISCUSIÓN	85
9. CONCLUSIONES	93
10. BIBLIOGRAFÍA	95

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Estructura y composición del virion.	14
Figura 2. Principales eventos durante el ciclo infeccioso de rotavirus.	17
Figura 3. Ciclo de replicación del genoma de rotavirus.	19
Figura 4. Estructura de NSP2.	26
Figura 5. Similitud estructural del dominio C-terminal de NSP2 y el dominio catalítico de la proteína PKCI.	28
Figura 6. Mecanismo de reacción de hidrólisis de las proteínas HIT.	29
Figura 7. Inhibición de la actividad NTPasa y autofosforilación por el agente modificador DEPC.	32
Figura 8. Aminoácidos seleccionados para la modificación sitio dirigida en NSP2.	48
Figura 9. Motivo <i>tipo-HIT</i> en NSP2.	49
Figura 10. Actividad NTPasa y autofosforilación de las distintas proteínas modificadas de NSP2.	52
Figura 11. Simulación de la unión del ATP a la proteína NSP2.	55
Figura 12. Naturaleza electropositiva de la hendidura de NSP2.	56
Figura 13. NSP2 es una proteína que une ATP.	60
Figura 14. Requerimiento del Mg^{2+} en la unión e hidrólisis del ATP.	64
Figura 15. Relación entre la cinética de hidrólisis y autofosforilación.	67
Figura 16. Estabilidad del fosfoaminoácido de la proteína NSP2 silvestre y modificada <i>H221A</i> .	72

Figura 17.	Interacción proteína-RNA en las distintas proteínas modificadas de NSP2.	76
Figura 18.	Efecto de la actividad NTPasa de NSP2 en la fosforilación <i>in vitro</i> de NSP5.	78
Figura 19.	Efecto de la actividad NTPasa de NSP2 en la hiperfosforilación <i>in vivo</i> de NSP5.	80
Figura 20.	Importancia de la actividad NTPasa de NSP2 en la formación de estructuras tipo-viroplasma.	83

LISTA DE TABLAS

Tabla I.	Partidores utilizados en el estudio.	35
Tabla II.	Parámetros cinéticos de las proteínas NSP2 silvestre y mutantes.	69

ABREVIATURAS

TLPs	: Partículas de triple cubierta.
DLPs	: Partículas de doble cubierta.
dsRNA	: RNA de doble hebra.
mRNA	: RNA mensajero.
VP	: Proteína estructural.
NSP	: Proteína no estructural.
Mutante <i>ts</i>	: Mutante termo sensible.
RIs	: Intermediarios de replicación.
SVPs	: Partículas subvirales.
HIT	: Tríada de histidinas.
N-terminal	: Amino terminal.
C-terminal	: Carboxi terminal.
NTP	: Nucleósido trifosfato.
NDP	: Nucleósido difosfato.
NMP	: Nucleósido monofosfato.
NTPasa	: Actividad nucleósido trifosfato hidrolasa.
MOI	: Multiplicidad de infección.
p.i.	: Post infección.
<i>wt</i>	: Proteína silvestre.
<i>mt</i>	: Proteína modificada.

RESUMEN

Rotavirus, miembro de la familia *Reoviridae*, es la principal causa de gastroenteritis severa en infantes y lactantes en el mundo. La partícula viral infectiva o virión esta constituida por tres cubiertas proteicas icosaédricas y posee un genoma compuesto por 11 segmentos de RNA de doble hebra (dsRNA). Estos segmentos codifican para seis proteínas estructurales y seis proteínas no estructurales. El segmento 8 codifica para la proteína no estructural 2 (NSP2). NSP2 es una proteína conservada de naturaleza básica y con una masa aproximada de 35 kDa. NSP2 se organiza en forma de octámeros, los cuales son altamente estables y representan la forma funcional de la proteína. Se ha propuesto que los octámeros funcionan como motores moleculares durante el empaquetamiento del genoma segmentado del virus. Los octámeros poseen diversas características que favorecen esa función, entre ellas: son cruciales en el armado de los sitios de replicación viral (viroplasmos), presentan capacidad de unión con el RNA, una actividad desestabilizadora de duplex de RNA y una actividad NTPasa dependiente de Mg^{2+} . La autofosforilación de la proteína está asociada a la actividad NTPasa dado a que existe una transferencia del fosfato gamma a la proteína, luego de la hidrólisis del nucleótido trifosfato (NTP). La comparación de la estructura de NSP2 con las distintas estructuras en el banco de datos (pdb), permitió encontrar una gran similitud estructural entre el dominio C-terminal de NSP2 y el dominio catalítico de la súper familia de nucleotidil hidrolasas (proteínas HIT). Esta similitud a su vez permitió distinguir el posible sitio activo de la enzima, y por lo tanto postular al sitio de unión e hidrólisis del NTP en NSP2. El siguiente trabajo, a través de modificación sitio-especifica

y simulaciones de unión (docking) de ATP, identificó a la hendidura profunda del monómero de NSP2 como el sitio de hidrólisis del NTP. Aunque NSP2 carece del clásico motivo HIT (HØHØHØØ donde Ø es un residuo hidrofóbico), los resultados obtenidos demuestran que las histidinas H221 y H225, como también otros residuos básicos conservados de la hendidura representan aminoácidos críticos del sitio activo de la enzima. Los resultados también sugieren que la autofosforilación representa a un intermediario fosforilado de la reacción, semejante a los eventos que ocurren en la hidrólisis del NTP por parte de las proteínas HIT. Este novedoso sitio de unión e hidrólisis, presenta tanto similitudes con la súper familia de proteínas HIT, como también características únicas posiblemente limitadas solamente a las proteínas NSP2 de rotavirus. Los resultados a su vez indican que el requerimiento del ion Mg^{2+} en la actividad NTPasa es primordialmente a nivel de la hidrólisis del NTP y no a nivel de la unión de este a la proteína, en contraste a lo ocurrido en las proteínas HIT. Las mutantes severamente afectadas en su actividad NTPasa sirvieron para demostrar que *in vitro*, la actividad NTPasa de NSP2 tiene un efecto positivo sobre la fosforilación de la proteína NSP5, aunque esta actividad no es un predictor fiel del grado de fosforilación de NSP5. Los resultados sugieren además que no existe una transferencia del fosfato de NSP2 a NSP5. Ensayos posteriores de expresión transiente de las proteínas en células de mamífero sirvieron para evaluar el impacto de la actividad NTPasa de NSP2 *in vivo*. Los resultados indican que la actividad NTPasa no afecta la hiperfosforilación de la proteína NSP5 ni su interacción con esta proteína para formar estructuras tipo viroplasma. Finalmente, los resultados obtenidos en este estudio permiten postular que la actividad NTPasa tiene una función posterior a la formación de los viroplasma.

SUMMARY

Rotaviruses, members of the *Reoviridae*, are a major cause of acute gastroenteritis in infants and young children worldwide. The virion is a triple-layered icosahedron with a genome consisting of eleven segments of double-stranded RNA (dsRNA) that encode for six structural and six nonstructural proteins. Gene segment eight encodes for the nonstructural protein 2 (NSP2). NSP2 is a conserved, basic nonstructural protein ($M_r=35,000$) encoded by the virus that is necessary for replication and packaging. NSP2 self-assembles into stable octamers. Octamers formed by the nonstructural protein NSP2 of rotavirus are proposed to function as molecular motors in the packaging of the segmented double-stranded RNA genome. The octamers have RNA binding, helix unwinding, and Mg^{2+} -dependent NTPase activities and play a crucial role in assembly of viral replication factories (viroplasms). The NTPase activity is associated with autophosphorylation of the protein via linkage of the cleaved γ -phosphate. Comparison of x-ray structures has revealed significant structural similarity between the C-terminal domain of NSP2 and catalytic domain of the histidine triad (HIT) family of nucleotidyl hydrolases, which in turn has suggested the location of the active site for NTP hydrolysis in NSP2. Consistent with the structural predictions, we show here using site-specific mutagenesis, and ATP docking simulations that the active site for NTP hydrolysis is localized to residues within a 25-Å-deep cleft between the C- and N-terminal domains of the NSP2 monomer. Although lacking the precise signature HIT motif (HØHØHØØ where Ø is a hydrophobic residue), our analyses demonstrate that histidines (His221 and His225) and other conserved basic amino acids represent critical residues of the active site. Similar to events occurring during nucleotide hydrolysis by HIT proteins, NTP hydrolysis by NSP2 was

found to produce a short lived phosphorylated intermediate. This novel site beside of showing similar features to HIT superfamily of proteins, presents unique characteristics probably intrinsic or limited to only rotaviruses NSP2 proteins. In contrast with HIT proteins, the requirement for Mg^{2+} seems to be specially needed for hydrolysis and not for binding of the NTP. Severely affected mutants helped to show that the NTPase activity has a positive effect on the *in vitro* NSP5 phosphorylation, but also that it is not a direct predictor of the extent of NSP5 phosphorylation. Analysis of protein phosphorylation suggests that a phosphor transference does not occur between the two proteins. Further evaluation of the biological importance of the NTPase activity of NSP2 by transient expression in mammalian cells showed that such activity has no impact on the ability of NSP2 to induce the hyperphosphorylation of NSP5 or to interact with NSP5 to form viroplasm-like structures. Hence the NTPase activity of NSP2 probably has a role subsequent to the formation of viroplasms.

INTRODUCCION

1.- Generalidades.-

Los rotavirus, miembros de la familia *Reoviridae*, son virus que poseen un genoma segmentado compuesto por 11 segmentos de RNA de doble hebra (dsRNA) y son la causa principal de gastroenteritis severa en infantes y lactantes en todo el mundo (Kapikian et al., 2001). El numero aproximado de muertes por año debido a infecciones por rotavirus en el mundo es aproximadamente de 500.000 (Parashar et al., 2003). Rotavirus también es causa de enfermedades entéricas en otros vertebrados tales como reptiles, aves y mamíferos (Kapikian et al., 2001). En la actualidad se han descrito y caracterizado diversas cepas de rotavirus que se encuentren ampliamente distribuidas en el mundo y debido a que estas exhiben un limitado tropismo y/o rango de huéspedes, es desconocido si la zoonosis representa un riesgo para la salud humana (Estes, 2001).

Sobre la base de criterios serológicos, es decir de clasificación basándose en la reactividad antigénica, los rotavirus han sido clasificado en tres grupos A, B y C (Nakata et al., 1986). El grupo A es el más abundante en todas las especies animales y este a su vez, esta clasificado en diferentes tipos de acuerdo con las propiedades serológicas que presentan sus antígenos neutralizantes (Hoshino et al., 1985). Inicialmente, las partículas de rotavirus fueron identificadas mediante microscopia electrónica a partir de suspensiones filtradas provenientes de muestras fecales de animales enfermos (Kapikian et al., 1974). El nombre de rotavirus proviene de una característica apariencia semejante a una "rueda" (en latín rota significa rueda) (Flewett et al., 1974). Estudios posteriores establecieron que las partículas virales son icosahedros compuestos de tres capas o



cubiertas proteicas (Prasad et al., 1988). El core de la partícula de triple cubierta (TLP) contiene los once segmentos de dsRNA que constituyen el material genómico del virus (Kapahnke et al., 1986, Labbe et al., 1994, Prasad et al., 1996). Los segmentos en su gran mayoría son monocistronicos codificando una de seis proteínas estructurales (VPs) o no estructurales (NSP) (Figura 1) (Bellamy & Both, 1990, Estes et al., 1983), exceptuando al segmento 11 que codifica para dos proteínas. La mayoría de los datos acerca de la estructura de los viriones provinieron de las observaciones obtenidas por criomicroscopía electrónica (cryo-EM) y reconstrucción tridimensional de los datos (Prasad et al., 1988, Shaw et al., 1993). La información relacionada con la función y ubicación de la VPs fue obtenida mediante estudios de mutantes termo sensibles (*ts*) del virus, virus reordenantes, partículas tipo-virus y proteínas recombinantes (Lawton et al., 1997b, Patton, 1995, Ramig & Petrie, 1984).

2.- Estructura del virion.-

La cubierta externa proteica esta constituida por dos proteínas virales, VP7 y VP4, éstas, representan los principales antígenos de neutralización del virus y han sido utilizados para clasificar rotavirus en diversos serotipos (1). VP7, la proteína principal de la cápside, es glicosilada y está dispuesta en el virión con una simetría icosaédrica de $T=13$ (8, 20). VP4 se encuentra en forma de dímeros, los cuales se asemejan a espigas que se extienden al exterior desde la matriz formada por la proteína VP7 (Fig. 1) (Prasad et al., 1988, Yeager et al., 1994, Yeager et al., 1990). La cubierta proteica intermedia esta formada por 260 trímeros de la proteína VP6, organizada también en una simetría $T=13$ (Hsu et al., 1997, Prasad et al., 1988). La cubierta formada por VP6 contiene múltiples

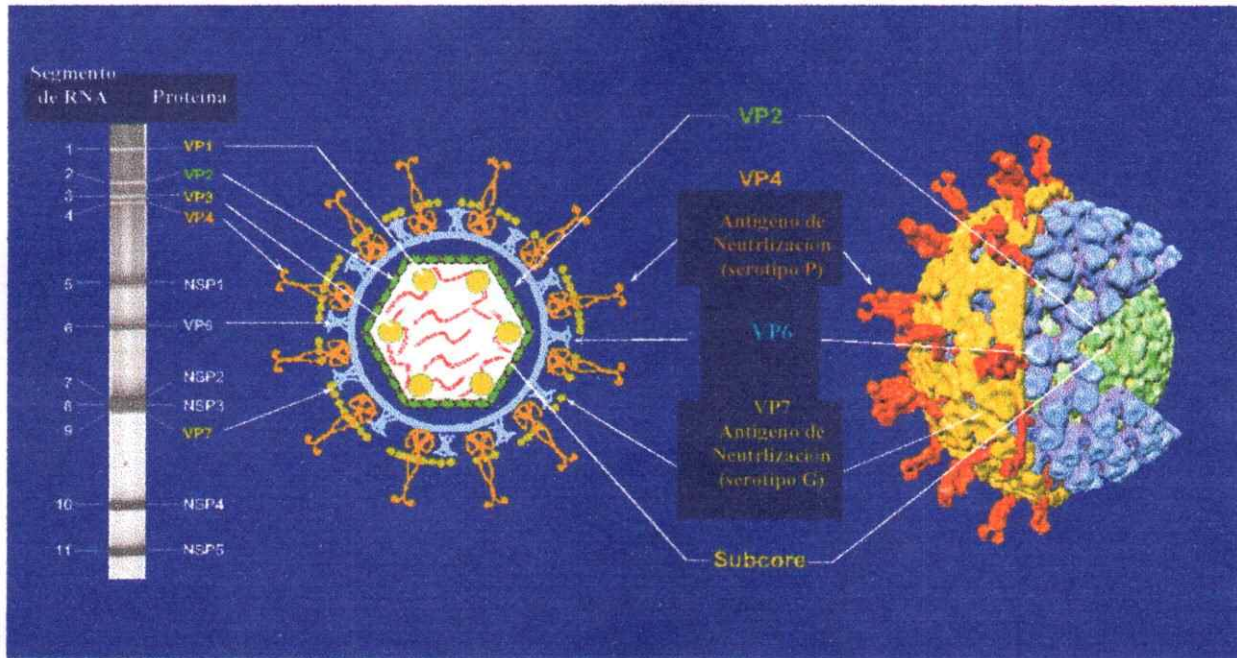


Figura 1. Estructura y composición del virion. *Izquierda:* Se observa la separación por electroforesis de los segmentos genómicos de dsRNA de rotavirus cepa SA11 y se indica las proteínas codificadas por cada uno de estos segmentos. *Medio:* Se observa una representación esquemática de la posición de las proteínas estructurales en la partícula viral. *Derecha:* Se observan distintos cortes de la estructura tridimensional de 23 Å de la partícula de rotavirus, en la cual se observan claramente la cubierta proteica externa, intermedia e interna. La figura se obtuvo gracias a la gentileza de Jayaram, H. y Prasad B.V.V.

canales sobre o cercanos a cada uno de los vértices que se extienden desde la capa intermedia hacia la capa interna de los viriones (11). Estos canales serían críticos para el paso de sustratos (por ejemplo: NTP's) y metabolitos, desde y hacia la polimerasa del virus para poder ser usados en la síntesis y exportación de los RNA mensajeros (mRNA) virales (Lawton et al., 1997a, Sandino et al., 1986). Hasta el momento se ha identificado, dependiendo de su ubicación y características, la presencia de tres tipos de canales (tipo I, II y III). Los canales de tipo I se encuentran posicionados sobre los vértices y conducen a las dos enzimas encargadas de sintetizar los mRNA virales presentes en el core viral. Estas enzimas son una RNA polimerasa RNA-dependiente, VP1, y una guanilil- y metil-transferasa, VP3 (Liu et al., 1992, Pizarro et al., 1991, Valenzuela et al., 1991). La cubierta más interna es el core viral y está formado por 60 dímeros de la proteína VP2, la cual se encuentra organizada en una simetría T=1 (Lawton et al., 1997b). Al interior de la cubierta formada por VP2, y ubicadas en cada uno de los doce vértices de la cápside viral se encuentra una copia de cada una de las proteínas VP1 y VP3. Crío-microscopía electrónica y mapas de densidad electrónica indican que los segmentos de dsRNA del genoma viral estarían organizados de una manera estructurada y ordenada, formando una estructura tipo tirabuzón en cada uno de los vértices (Prasad et al., 1988). Estudios posteriores sugieren que en cada uno de los vértices se encontraría un segmento distinto del genoma viral interactuando con una molécula de VP1 y de VP3 (Lawton et al., 1997a, Prasad et al., 1996).

3.- Ciclo Infeccioso.-

El mecanismo por el cual el virus utiliza para ingresar a la célula, así como el receptor aun no están totalmente esclarecidos. Al parecer existe mas de una vía de entrada, como también la posible utilización de mas de un receptor para la entrada del virus a la célula dependiendo del grupo o cepa de rotavirus (Sanchez-San Martin et al., 2004, Tihova et al., 2001). Por ejemplo, se postula que la partícula viral podría ingresar a la célula ya sea directamente, por disrupción de la membrana citoplasmática celular, o indirectamente, es decir por endocitosis mediada por receptores celulares (Lopez & Arias, 2004). La transcripción viral o síntesis de la hebra positiva usando como molde el genoma de doble hebra, presumiblemente comienza tan pronto como el virus entra a la célula y pierde la capa externa proteica (V4 y VP7) (Fig. 2). La síntesis de los once mRNAs virales se puede detectar a partir de la primera hora post infección (Patton, 1990). Los mRNA virales sintetizados al interior de la célula son usados tanto en la traducción para la síntesis de proteínas virales, como moldes en la síntesis de la hebra negativa (replicación) y posterior formación del genoma viral (dsRNA) (Gallegos & Patton, 1989, Helmberger-Jones & Patton, 1986).

Se conoce la secuencia nucleotídica de los once segmentos genómicos en varias cepas de rotavirus (3). En el caso del grupo más conocido, el grupo A, la hebra positiva de cada segmento empieza con un cap metilado, seguido de una típica secuencia conservada 5'-GGCU/AU/AUU/AA/UA/U-3' en el extremo 5' no traducido (UTRs) o no codificante. En caso de los extremos 3' UTR, estos no poseen un tracto poli (A); pero si en cambio presentan, en la gran mayoría de los casos una secuencia conservada 5'-

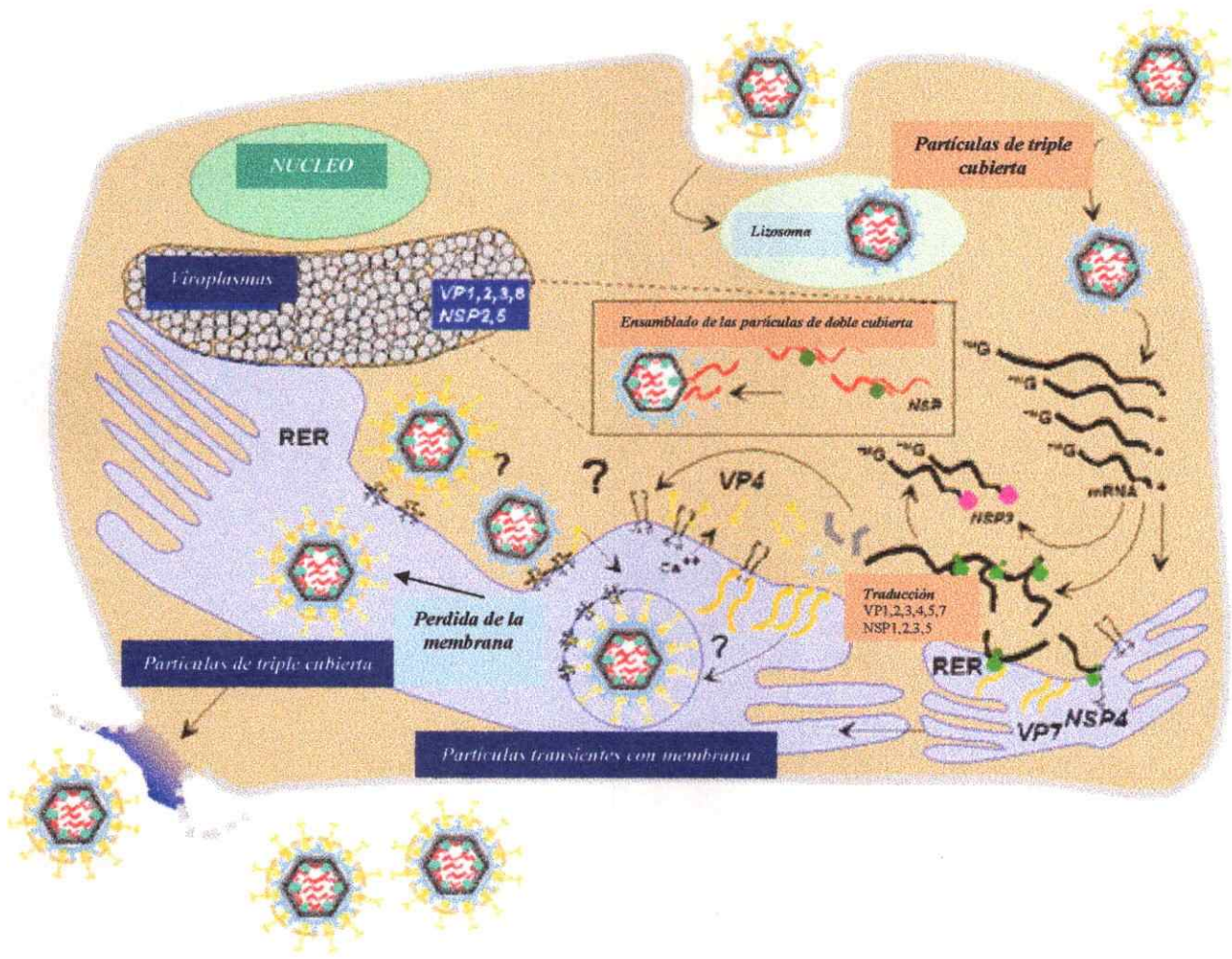


Figura 2. Principales eventos durante el ciclo infeccioso de rotavirus. Una vez ocurrida la entrada del virus a la célula, y subsiguiente pérdida de la cubierta proteica externa, la partícula de doble cubierta transcribe los once mensajeros virales en el citoplasma de la célula infectada. Los mensajeros son utilizados en la síntesis de las proteínas virales como en la posterior síntesis de la hebra negativa del genoma viral, donde son utilizados como plantillas. Este proceso ocurre en estructuras citoplasmáticas de replicación y encapsidación viral llamados viroplasmos. En la periferia de estas estructuras el core viral recién ensamblado adquiere la cubierta intermedia. Parte de estas nuevas partículas de doble cubierta pueden empezar nuevamente el proceso de transcripción (amplificación), mientras que otra parte son capturadas en el retículo endoplasmático para la obtención de la triple cubierta (TLP) y la formación de un estado transiente membranoso. La partícula de triple cubierta pierde el manto lipídico tras su paso por el ER. La acumulación de estas TLPs produce la lisis celular y consecuente liberación de las partículas virales infectivas. La figura se obtuvo gracias a la gentileza de Jayaram, H. y Prasad B.V.V.

UGUGACC-3' (Imai et al., 1983, McCrae & McCorquodale, 1983, Mitchell & Both, 1990). La existencia del cap en las hebras positivas de los segmentos genómicos (dsRNA) favorecen la idea que los RNAs que son usados en la traducción (mRNA virales) son también usados como templados en la síntesis de la hebra negativa (Fig. 3). Los extremos conservados en los mRNA virales son críticos tanto para la traducción como para la replicación, debido a que las señales "cis-acting" que presentan son importantes tanto para la formación de los complejos de iniciación en la síntesis de la hebra negativa como para la circularización del polisoma en la traducción (Chizhikov & Patton, 2000, Patton et al., 1996, Piron et al., 1998, Poncet et al., 1994, Vende et al., 2000, Wentz et al., 1996a, Wentz et al., 1996b).

La síntesis del genoma (dsRNA) es inicialmente detectada a las 3 a 4 horas post infección y ocurre en inclusiones perinucleares electro-densas que se forman en el citoplasma de las células infectadas (Patton, 1990, Petrie et al., 1982). Estas inclusiones, llamadas viroplasmas, son sitios donde sucede el armado del core y de las partículas de doble cubierta (DLPs) (Petrie et al., 1982, Petrie et al., 1984). El fraccionamiento de células infectadas utilizando métodos de centrifugación, ha permitido la purificación de partículas subvirales (SVPs). Estas SVPs se encuentran en diversos estadios de la síntesis de la hebra negativa. El análisis de estas SVPs permitió observar que mientras es sintetizada la hebra negativa, los productos (dsRNAs) son simultáneamente internalizados en intermediarios de replicación (RIs) estructuralmente similares a los cores (core RIs) o cores que poseen una capa parcial de VP6 (core/VP6 RIs) (Clapp & Patton, 1991, Gallegos & Patton, 1989, Helmberger-Jones & Patton, 1986, Patton & Gallegos, 1990). El resultado de este proceso de replicación y empaquetamiento es un

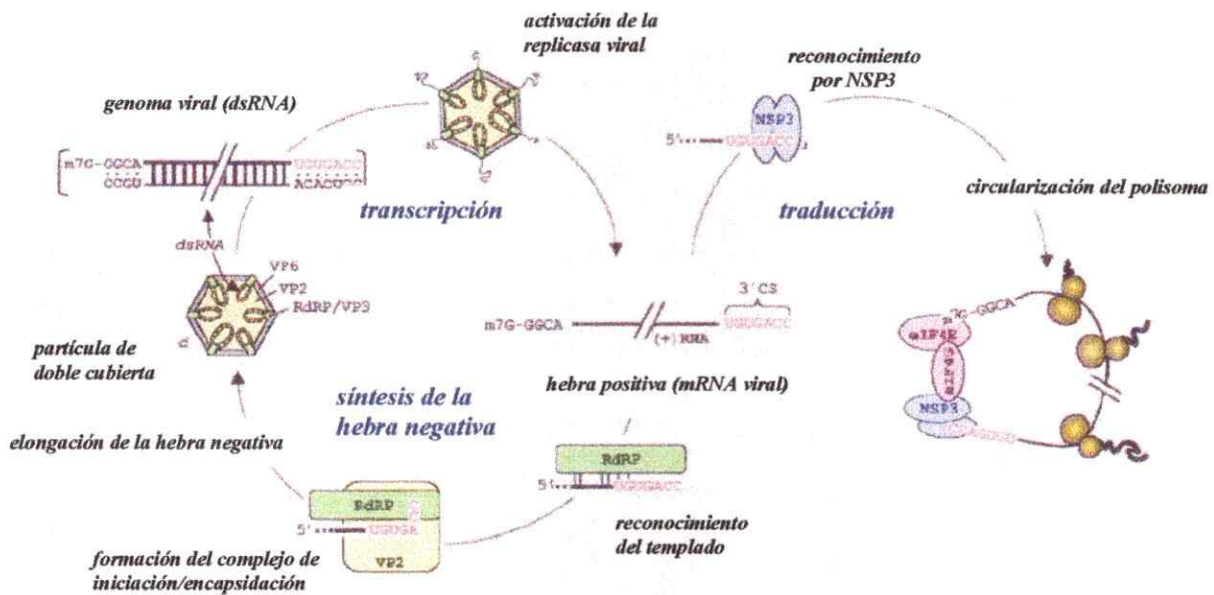


Figura 3. Ciclo de replicación del genoma de rotavirus. El esquema muestra tres de los eventos en que participa el RNA viral: transcripción, síntesis de la hebra negativa/empaquetamiento y traducción. Los once segmentos de RNA de rotavirus contienen secuencias altamente conservadas en sus extremos 5' y 3'. Las nucleótidos conservados en el extremo 3' de la hebra positiva (color rojo) están implicados en varios de los eventos del ciclo replicativo de rotavirus. Uno de ellos es en el reconocimiento por parte de la polimerasa viral en la síntesis de la hebra negativa y el otro es en el reconocimiento por parte de la proteína NSP3 en la traducción de los mRNAs virales. La activación de partícula de doble cubierta da a lugar la síntesis de los once mensajeros virales. Posterior a la traducción de los mensajeros virales, la polimerasa viral reconoce las señales presentes en extremo 3' de la hebra positiva. El reconocimiento del templado es seguido por la formación del complejo de iniciación de la hebra negativa, un evento que requiere la presencia de las dos últimas citocinas conservadas en el extremo 3', GTP, la polimerasa y la proteína del core VP2. Luego de ocurrida la encapsidación y elongación de los segmentos virales, la obtención de la cubierta intermedia (compuesta por la proteína VP6) produce la formación de nuevas partículas de doble cubierta. La figura fue gentilmente provista por el Dr. Patton.

intermediario que contiene el set completo de los 11 dsRNAs genómicos. La composición de las SVPs, detectada por análisis electroforético, incluye a las proteínas estructurales del core y de las DLPs (VP1, VP2, VP3, y VP6) como también a las proteínas no estructurales NSP2 y NSP5 (Gallegos & Patton, 1989, Helmberger-Jones & Patton, 1986). Las SVPs representa una mezcla heterogénea, donde los core y core/VP6 RI son sólo dos de los componentes. La caracterización de estas mezclas llevó al descubrimiento de otro complejo presente en las preparaciones de SVPs. Este otro complejo fue designado precore RI y sería el precursor del core RI. Los componentes de éste incluyen a las proteínas VP1, VP3, NSP2, NSP5 y al mRNA viral (Gallegos & Patton, 1989, Helmberger-Jones & Patton, 1986). Se cree que los precore RIs sirven como puntos de nucleación donde ya en presencia de VP2 se formarían posteriormente los vértices de la capa interna. Finalmente ha medida que los pentámeros de VP2 interactúan entre ellos y con VP1, VP3 y el mRNA viral, el core se cerraría y ocurriría en forma simultáneamente la elongación de la hebra negativa.

La formación de las DLPs ocurre en la periferia del viroplasma, donde el core obtiene presumiblemente la capa intermedia de VP6. Una vez adquirida la capa intermedia, las DLPs presumiblemente por la interacción de la proteína VP6 y la proteína de membrana NSP4, son secuestradas al retículo endoplasmático (ER) que se encuentra contiguo al viroplasma (Gonzalez et al., 2000, Petrie et al., 1982, Petrie et al., 1984). La cubierta externa (VP4 y VP7) es adquirida en la entrada al ER formando un intermediario que posee membrana lipídica, un fenómeno no común en los virus (Gonzalez et al., 2000, Soler et al., 1982). La membrana es mantenida hasta la salida de la nueva partícula TLP del ER. La liberación de la partícula del organelo y de su estado membranoso se debe

presumiblemente a la proteólisis parcial de la proteína VP7, ya que esto produce que la interacción con NSP4 y con la membrana deje de ser mantenida. La posterior acumulación de las partículas virales en el citoplasma de la célula produce la citólisis y consecuente liberación de las partículas virales al medio extracelular. Debido a que rotavirus produce un alto número de partículas infectivas en cada ciclo (alto título viral), se cree que el proceso de selección de los distintos segmentos (uno de cada uno) es altamente eficiente.

4. Proteínas no estructurales 1, 3, 4 y 6.-

Las proteínas no estructurales en rotavirus participan durante el ciclo infectivo del virus en la célula. El rol de las proteínas no estructurales en el ciclo viral es diverso. La proteína NSP1 juega un rol importante en infecciones virales productivas en animales, siendo un factor de virulencia del virus (Kapikian et al., 2001, Taniguchi et al., 1996). Se postula que interactúa con el factor de transcripción celular IRF-3 y por lo tanto inhibiría la producción de interferón α , el cual es producido en la célula en respuesta a la infección viral (Graff et al., 2002). En el caso de la proteína NSP3, esta participa en la traducción de los genes virales, interactuando específicamente con los últimos nucleótidos de los mRNA virales y a la vez con el factor de traducción eIFG4 (el factor de iniciación celular que reconoce al cap). Esta interacción hace posible la circularización del mRNA viral y produce una eficiente síntesis proteica (Piron et al., 1998, Poncet et al., 1994, Vende et al., 2000). La proteína NSP4 tiene diversas funciones dependiendo de su localización, entre ellas se encuentran la de interactuar con VP6 y secuestrar las DLPs en el ER, y la de actuar como toxina viral (interactúa e inhibe los canales de cloro en el epitelio

gastrointestinal) (Dong et al., 1997, Taylor et al., 1996). El rol de la proteína NSP6, codificada por el segundo marco de lectura del segmento 11 es desconocido. Generalmente se resta importancia al posible rol cumplido por esta proteína, ya que existen diversas cepas que carecen del segundo marco de lectura (por lo tanto de la expresión de esta proteína) y no presentan ningún efecto notorio en el ciclo infectivo.

5. Proteínas no estructurales 2 y 5.-

Solamente dos de las seis proteínas no estructurales codificadas por el virus, NSP2 y NSP5, son necesarias para la replicación y empaquetamiento del genoma viral. NSP2 (35 kDa) es una proteína básica (*pI* 9.1), que posee diversas funciones y actividades. NSP2 en solución se encuentra en forma de octámeros estables, probablemente a partir de la interacción de dos tetrameros. Su estado multimérico fue descrito mediante diversas técnicas como: ultracentrifugación analítica (AU), cristalografía y crío-microscopía electrónica (Jayaram et al., 2002, Schuck et al., 2001). Los octámeros son la forma funcional de la proteína y son capaces de unir RNA de simple hebra de un modo cooperativo, dando lugar a complejos de alta organización compuestos por una sola molécula de RNA y varias copias del octámero (Taraporewala et al., 1999). La interacción con el RNA es de alta afinidad y de una manera no específica (Taraporewala et al., 1999, Taraporewala et al., 2002). Los octámeros de NSP2 también poseen una actividad desestabilizadora de duples (doble hélices) de RNA (Taraporewala & Patton, 2001). Esta actividad es independiente de la presencia de nucleótidos o Mg^{2+} , la cual difiere con una actividad helicasa clásica. Esta función se ha sugerido importante para remover los duplex parciales de RNA-RNA que se formen en el

mRNA viral y que puedan inhibir el empaquetamiento y/o replicación de RNA genómico (Patton & Spencer, 2000). Además de la actividad desestabilizadora de RNA, los octámeros de NSP2 poseen una actividad de nucleósido trifosfato hidrolasa (NTPasa) dependiente de Mg^{2+} , la cual puede catalizar la hidrólisis del enlace fosfoanhidro γ - β de cada uno de los cuatro ribonucleósidos trifosfato (NTPs). Esta última actividad está asociada con la transferencia del fosfato gamma a la proteína y la consecuente autofosforilación (Taraporewala et al., 1999). Los octámeros de NSP2 en presencia de Mg^{2+} y NTPs o nucleósidos difosfato (NDPs) o análogos no hidrolizables de estos, sufren un cambio conformacional que genera una forma mas condensada y muestra un aumento en su velocidad de sedimentación (Schuck et al., 2001). Las características en conjunto que posee NSP2 han servido para que esta sea postulada como posible motor molecular, aportando la energía necesaria para el empaquetamiento y/o replicación del genoma viral a través de su actividad NTPasa.

La proteína NSP5 (26 kDa), el otro componente del sistema, es una proteína dimérica y de naturaleza acídica (dado su alto contenido de serinas y treoninas) (Afrikanova et al., 1996, Torres-Vega et al., 2000). NSP5 también posee afinidad por el RNA, tanto de simple hebra como de doble hebra (Vende et al., 2002). Esta proteína sufre extensas modificaciones postraduccionales tales como O-glicosilaciones y fosforilaciones (Afrikanova et al., 1996, Gonzalez & Burrone, 1991). Existen diversos sitios de fosforilación en NSP5, de manera tal que existen un rango bastante amplio de isoformas fosforiladas con masa molecular entre 28 y 32-34 kDa en células infectadas o trasfectadas (Afrikanova et al., 1996, Blackhall et al., 1998, Eichwald et al., 2002, Poncet et al., 1997). NSP5 posee una actividad autoquinasa mínima, sin embargo en presencia de

NSP2, la fosforilación de NSP5 se ve aumentada tanto *in vitro* como *in vivo* (Afrikanova et al., 1998, Vende et al., 2002). El mecanismo por el cual NSP2 promueve la fosforilación de NSP5 es desconocido. La fosforilación de NSP5 se puede dividir entre un estado de fosforilación (en el que la proteína migra en un gel denaturante a un peso molecular aparente de 28 kDa) y un estado de hiperfosforilación (migración en un rango de 32-34 kDa). El estado de hiperfosforilación es solamente observado *in vivo*, en células co-transfectadas con NSP2 y NSP5 o en células infectadas por el virus. El rol que cumple tanto la fosforilación como la hiperfosforilación de la proteína NSP5 en el ciclo viral no está claramente dilucidado, sin embargo estudios previos sugieren que cambios en el estado de fosforilación de NSP5 pueden tener un efecto sobre el ciclo viral como en la virulencia de rotavirus (Chnaiderman Xiao et al., 2002).

La función de estas dos proteínas en la replicación y la encapsidación del RNA es poco conocido. Estudios provenientes de una mutante termo sensible (*tsE*) de rotavirus cepa SA11 cuya mutación localiza en el segmento 8, el cual codifica para NSP2, indican que esta proteína tiene un rol importante en estos procesos (Gombold et al., 1985). Específicamente, a temperatura no permisiva (39°C), y a pesar de existir la producción de proteínas virales, las células *tsE*-infectadas son defectivas en la producción del mRNA viral y de dsRNA, produciendo partículas del virus que están esencialmente vacías de material genómico (Ramig & Petrie, 1984). El otro aspecto resaltante de esta mutante, es la formación de viroplasmos que se encuentra severamente afectada a la temperatura no permisiva. La participación de NSP2 en la formación de viroplasmos es apoyada por el hecho que la co-expresión de NSP2 y NSP5 en células transfectadas genera inclusiones proteicas semejantes a las inclusiones formadas en células infectadas por rotavirus

(Fabbretti et al., 1999). Estas estructuras han sido descritas como estructuras tipo-viroplasma (VLS). El hecho que NSP2 y NSP5 sean constituyentes esenciales de los viroplasmas indica que estas proteínas no estructurales pueden estar participando ya sea directa o indirectamente en el reclutamiento de las proteínas estructurales (VP1, VP2, VP3 y VP6) a estos sitios de replicación y morfogénesis del pre-virión. Interesantemente, esta idea del reclutamiento se hace factible mediante el conocimiento de las interacciones que ocurre entre NSP2 y VP1, y entre NSP5 y VP2 (Afrikanova et al., 1998, Berois et al., 2003). Otra alternativa es que estas interacciones estén relacionadas con el rol de NSP2 y NSP5 en promover la síntesis de la hebra negativa del genoma viral y el armado de los cores al interior del viroplasma, y no *per se* en el reclutamiento físico de las proteínas estructurales a estos sitios.

6. Antecedentes del presente trabajo.-

Recientemente se resolvió la estructura del octámero de NSP2 mediante cristalografía de rayos X a una resolución de 2,6 Å (Jayaram et al., 2002). La estructura del octámero se asemeja a la de una rosquilla o picarón (“donut”) (Fig. 4A), teniendo dos tetrámeros asociados cola a cola (tail-to-tail) o carboxi con carboxi terminal. El análisis de la estructura permitió sugerir relaciones de estructura-función de la proteína. El octámero presenta cuatro grandes depresiones electropositivas, las cuales están ubicadas en la periferia de la proteína y son diagonales al eje de dos simetrías de la proteína. Estas depresiones han sido postuladas como sitios de interacción con el RNA de simple hebra debido a la abundancia en estas zonas de aminoácidos básicos y aromáticos. El centro del octámero es mayormente de naturaleza hidrofóbica y se postula como sitio de interacción

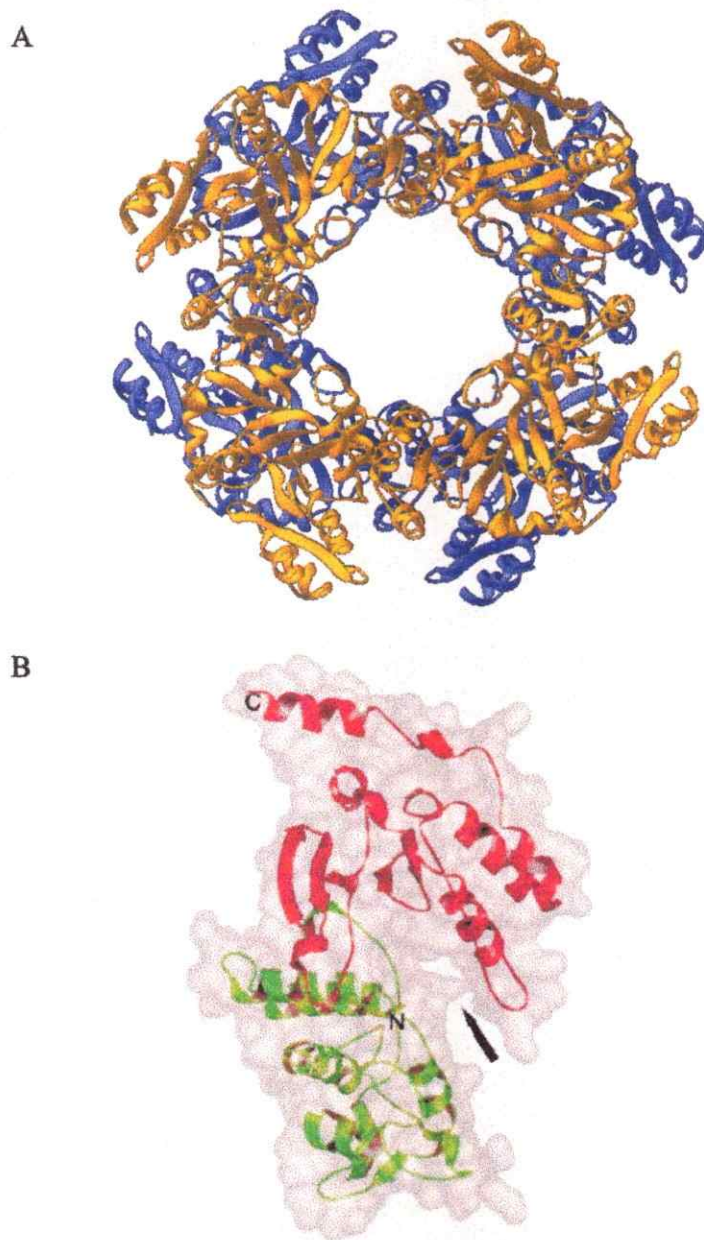


Figura 4. Estructura de NSP2. La estructura de NSP2 fue resuelta a una resolución de 2,6 Å mediante cristalografía y difracción de rayos X. **A)** Se observa la representación de la cadena alfa de la estructura cuaternaria de la proteína desde el eje de cuatro simetrías. Los dos tetrameros que componen el octamero de NSP2 se denotan en azul y amarillo. **B)** En la estructura del monómero de NSP2 se observa la presencia de dos dominios (N- y C-terminal). Entre los dominios se encuentra una hendidura profunda que fue postulada como posible sitio de unión e hidrólisis de los nucleótidos. La figura se obtuvo a partir de las imágenes gentilmente provistas por Jayaram, H. y Prasad B.V.V.

con la polimerasa VP1 y/o la fosfoproteína NSP5. En la estructura del monómero se pueden distinguir claramente dos dominios, como también la presencia de una hendidura profunda o "cleft" de 25 Å formada por ambos dominios (Fig. 4B). El dominio correspondiente al C-terminal (151-313) presenta una similitud estructural con el dominio catalítico de la proteína PKCI (protein kinase C interacting protein) (Fig. 5A), miembro prototipo de la super familia de proteínas celulares HIT, las cuales son nucleotidil hidrolasas y poseen un motivo característico compuesto por una tríada de histidinas, HØHØHØØ (donde Ø es un aminoácido hidrófobico) (Brenner, 2002, Brenner et al., 1999). En estas enzimas, las histidinas se necesitan para el ataque nucleofílico al fosforilo alfa del NTP con la formación concomitante de un intermediario nucleotilado (His-AMP) y la liberación de un pirofosfato (Fig. 6). El estado intermedio de la reacción finaliza por la hidrólisis del intermediario AMP-proteína por medio del ataque realizado por una molécula de agua reactiva (Brenner, 2002, Lima et al., 1997). El análisis estructural de la hendidura de NSP2, permitió sugerir un posible sitio de unión e hidrólisis de los NTPs. En este sitio se observa la presencia de varios residuos conservados que pueden ser requeridos en la unión e hidrólisis del NTP y en la coordinación del ion magnesio. Se pudo observar en la superimposición de las estructuras que dos de estos aminoácidos, la His221 y la His225, coinciden muy bien con las primeras dos histidinas catalíticas de las proteínas HIT (Fig. 5B) (Jayaram et al., 2002). Esta sorprendente similitud estructural puede indicar que existe una manera similar de unión e hidrólisis de los NTPs entre NSP2 y las proteínas HIT.

La posible participación de las histidinas en la hidrólisis de los NTPs no solo provino del análisis estructural de la superposición de las estructuras, sino también de

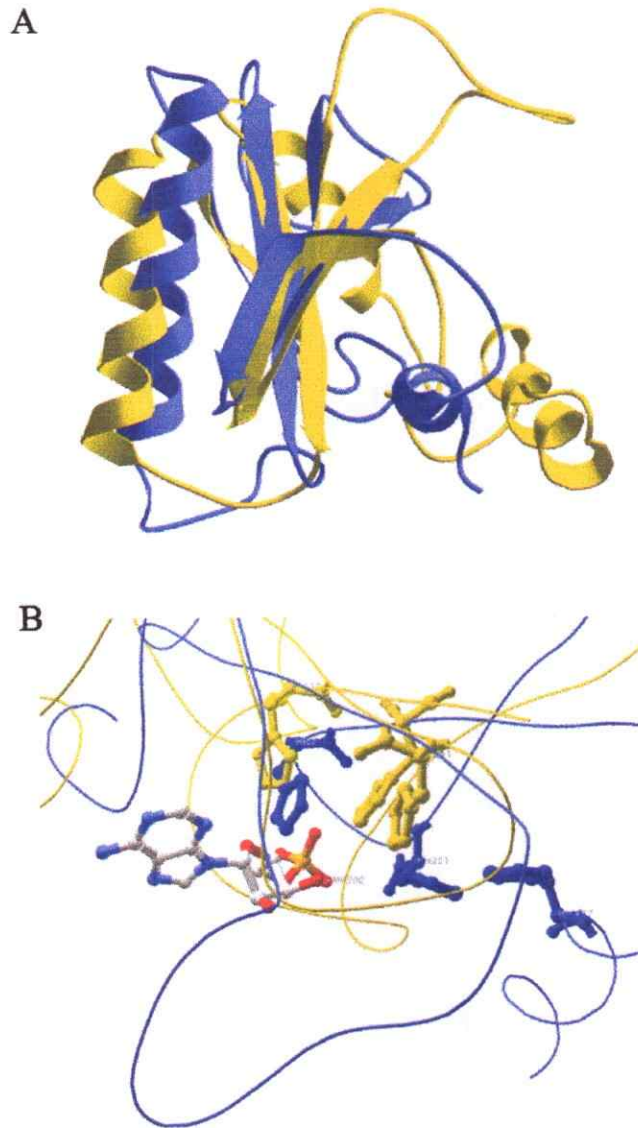


Figura 5. Similitud estructural del dominio C-terminal de NSP2 y el dominio catalítico de la proteína PKCI. El dominio carboxi terminal del monómero de NSP2 presenta similitud estructural con el dominio catalítico de un miembro prototipo de las proteínas HIT, la proteína PKCI. El dominio N-terminal de NSP2 posee un plegamiento único hasta el momento. La similitud estructural hace posible superponer ambas estructuras (*A*). En esta superposición también es posible observar como dos de las histidinas conservadas en NSP2 (H221-225) calzan de una manera sorprendente con dos de las histidinas de la tríada catalítica (H110-112) en PKCI (*B*). NSP2 se muestra en azul y PKCI en amarillo. En la Figura *B* se muestra un AMP presente en la cocrystalización de la proteína PKCI y el AMP. La figura se obtuvo gracias a la gentileza de Jayaram, H. y Prasad B.V.V.

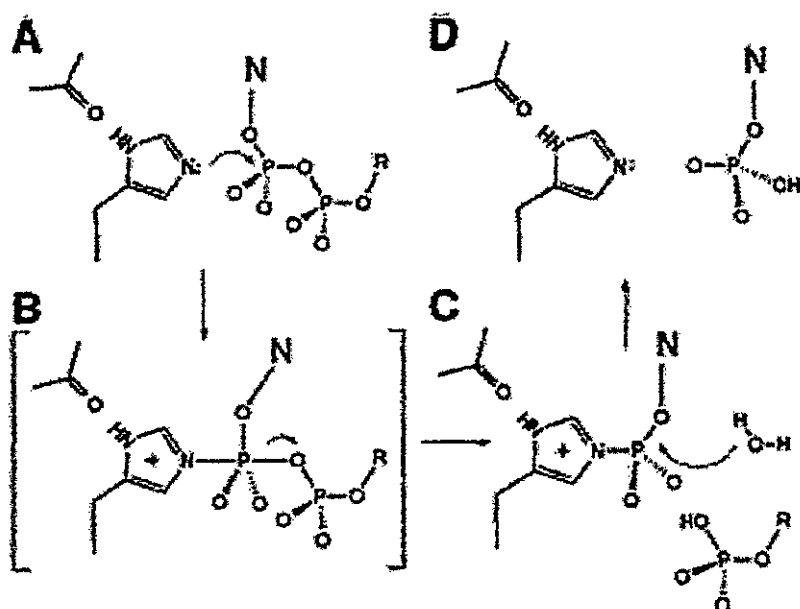


Figura 6. Mecanismo de reacción de hidrólisis de las proteínas HIT. *A*, La histidina catalítica (His112 en el caso de PKCI) realiza el ataque nucleofílico al fosfato α del NTP unido; *B*, se produce un estado de transición pentacovalente tras el ataque del grupo amino del anillo imidazólico de la histidina; *C*, el AMP permanece covalentemente unido a la proteína formando un intermediario de reacción fosfoproteína-AMP (este intermediario puede ser detectado por medio de electroforesis); *D*, el otro producto de la reacción es liberado de la proteína a causa de un segundo ataque nucleofílico por medio de una molécula de agua reactiva, la cual fue previamente activada por la tercera histidina de la tríada catalítica (His114 en PKCI). La figura se obtuvo y modificó a partir de la publicación de Lima *et al.*

análisis experimentales en los cuales se uso dietil pirocarbonato (DEPC) como agente modificador de histidinas (Pelton & Ganzhorn, 1992). Los resultados obtenidos indicaron que las histidinas participan de manera importante en la hidrólisis del ATP como en la autofosforilación de la proteína (Fig. 7). La presencia del agente modificador de histidinas (DEPC) afecta drásticamente ambos procesos aun a concentraciones muy bajas del agente (2mM). Los resultados preliminares también sirvieron para mostrar que existe una relación estrecha entre la actividad NTPasa de la proteína y su autofosforilación. Posterior al análisis de los antecedentes y teniendo como referente la similitud estructural presente entre NSP2 y las proteínas HIT surgieron las siguientes preguntas: ¿Es posible que ambas proteínas compartan una manera similar de unión e hidrólisis de los NTPs?; ¿Son las histidinas His221 y His225 críticas en la hidrólisis de los NTPs?, como es el caso de las histidinas catalíticas en las proteínas HIT; ¿Cuál es el aporte a la reacción de los otros aminoácidos conservados en la hendidura de NSP2 que fueron descritos en el análisis estructural y que no tienen equivalente en las proteínas HIT?. Para contestar estas preguntas no es suficiente el análisis estructural de la proteína sino su verificación mediante una correcta aproximación experimental, lo cual permita conectar las predicciones estructurales con los datos experimentales. En este estudio se realizaron dos aproximaciones distintas pero complementarias con el fin de contestar estas preguntas, una experimental (modificación sitio-dirigida) y otra computacional (modelación molecular). Finalmente en el estudio también se cuestionó el posible rol de la actividad NTPasa de NSP2 en las funciones relacionadas de la proteína y por lo tanto se realizó la siguiente pregunta: ¿Cuál es el efecto de la hidrólisis de los NTPs por parte de NSP2 en

la autofosforilación de la proteína, en la fosforilación de la proteína NSP5 y en la formación de los viroplasmos?.

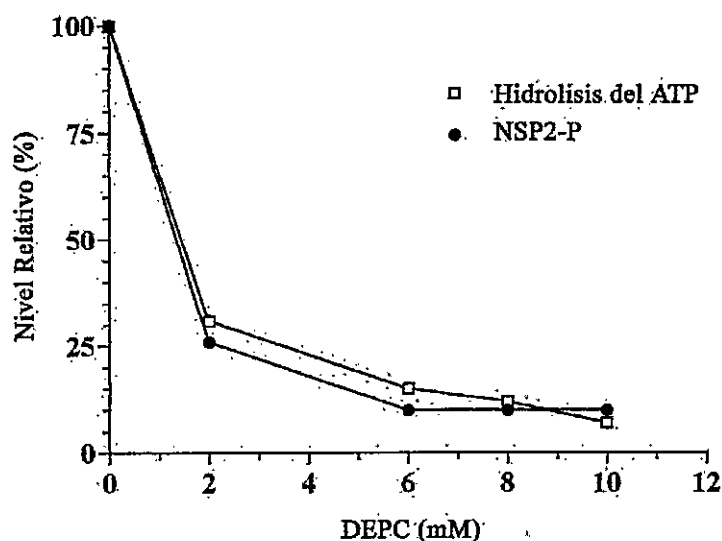


Figura 7. Inhibición de la actividad NTPasa y autofosforilación de NSP2 en presencia del agente modificador DEPC. La presencia del agente modificador de histidinas (DEPC) produce una drástica disminución tanto en la hidrólisis del ATP como en la autofosforilación de la proteína. Reacciones que contienen 56 pmol de NSP2, 50mM Tris-HCl (pH 7.5), 5mM MgCl₂, 10 μCi de [γ -³²P]ATP y diferentes cantidades de DEPC se incubaron por 1 hr a 37 °C. Se analizaron la mitad de las reacciones mediante TLC para observar la formación de ³²Pi y la otra mitad mediante SDS-PAGE para observar la autofosforilación de la proteína. Los niveles de marca radiactiva se cuantificaron mediante PhosphorImager.

Analizados los siguientes antecedentes se plantea la siguiente hipótesis y objetivos de esta tesis.

HIPOTESIS

“Los residuos del motivo *tipo-HIT* en NSP2, en especial las histidinas 221-225, son críticos para la hidrólisis de los NTPs”.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el rol del motivo *tipo-HIT* en la actividad NTPasa de la proteína NSP2 de rotavirus, para ayudar a entender el desconocido mecanismo de unión y hidrólisis de los NTPs en esta proteína.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- i)* Identificar y caracterizar el sitio activo de la proteína NSP2.
- ii)* Determinar el rol que cumple la hidrólisis de los NTPs en las funciones relacionadas de la proteína, tanto *in vitro* como *in vivo*.

MATERIALES Y METODOS

1. Cultivo celular y propagación viral.-

Células provenientes de riñón de mono rhesus (MA104) fueron mantenidas y crecidas en Medio 199 suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB). La cepa de rotavirus SA11 fue propagada y titulada en estas células. Previo a la infección de las células con rotavirus se realizó la activación del inoculo viral mediante incubación con tripsina (10 μ gr/ml) por 30 min a 37 °C. Posteriormente el inoculo viral fue diluido en Medio 199 hasta obtener la multiplicidad de infección (MOI) deseada (aproximadamente de 5) y se utilizó para infectar las células, previamente lavadas con buffer fosfato salino (PBS). Luego de una hora de adsorción, el inoculo fue removido y sustituido con Medio 199. En la propagación, se esperó hasta obtener un efecto citopático del 80 % previo a realizarse el congelamiento del nuevo stock viral. El titulo viral se determinó mediante ensayos de formación de placas de lisis.

2. Vectores de expresión y modificación sitio-dirigida.-

Los vectores de expresión en bacteria pQE60g8 (Taraporewala et al., 1999) y pQE30g11 (Vende et al., 2002), codifican para la proteína NSP2 con una cola de 6 His en el extremo C-terminal y para proteína NSP5 con una cola de 6 His en el extremo N-terminal, respectivamente. El marco de lectura abierto (ORF) del gen 8 que codifica a NSP2 fue mutado mediante la técnica de outward PCR usando la Pfu Turbo DNA polimerasa (Invitrogen). Los partidores usados en la modificación sitio-dirigida se muestran en la Tabla I. Posterior a la amplificación del vector pQE60g8 (94 °C por 2

TABLA I

Sentido	Secuencia	Mutante
Forward	5'-TTAGAAAATTTGGTGATACGTAAAG-3'	H110A
Forward	5'-GGAGAAATTGTATTTCAAAACGC-3'	E153A
Forward	5'- G CTTTAGAACATCAATTGATGCCAA-3'	Y171A
Forward	5'- G CAGTTACATTGAACGAAGATAAACC-3'	K188A
Forward	5'-ACAGCTGGTAAGGGTCATTATAGAATTG-3'	H221A*
Forward	5'-ACACATGGTGCGGGTCATTATAGAATTG-3'	K223A*
Forward	5'-ACACATGGTAAGGGTGCTTATAGAATTG-3'	H225A*
Forward	5'-ACACATGGTAAGGGTCATTATGCAATTG-3'	R227A*
Reverse	5'-AGCCCTTATTGATACTACTCGTGATA-3'	H110A
Reverse	5'-TCCTGCTGCAGTTATTGTAGTTTCAA-3'	E153A
Reverse	5'-AGTTAGTTTCCACATGGTGAAGGC-3'	Y171A
Reverse	5'-ATATTCAATAAAATTCTGATCCAG-3'	R188A
Reverse	5'-GATTACAGCAAACCTTGTTATATTGCC-3'	(*)
Forward	5'-CGGAATTCATGGCTGAGCTAGCTTGC-3'	(-)
Reverse	5'-CCGCTCGAGTTAAACGCCAACTTGAGA-3'	(-)

- * El partidador reverso (*) fue utilizado en combinación con los distintos partidadores "forward" para la amplificación de las mutantes indicadas con un asterisco. En **negrita** se denota el nucleótido sustituido para producir el cambio aminoácido deseado por alanina.
- (-) Las dos ultimas secuencias corresponden a los partidadores usados en la amplificación y posterior clonación en los vectores de transcripción T7. Los sitios de restricción EcoRI y XhoI se encuentran subrayados.

min, 1 ciclo; 94 °C por 30 sec (s), 50 °C por 30 s, 68 °C por 4 min, 35 ciclos; 68 °C por 6 min, 1 ciclo) usando la combinación adecuada de partidores, los productos de la amplificación: se purificaron por gel (geles de agarosa 0.9 %), se trataron con la DNA quinasa T4, se autoligaron y finalmente se transformaron en la bacteria *Escherichia coli* DH5 α . Los plasmidios que contienen la mutación esperada fueron identificados por secuenciación y posteriormente transformados a la cepa de *E.coli* M15(pREP4) para expresión.

Los vectores de transcripción T7: SP72g8, SP72g8/E153A, SP72g8/K188A, y SP72g8/H225A, usados en los ensayos de co-expresión en células de mamífero contienen al marco de lectura completo del gen 8 que codifica ya sea para la proteína silvestre (*wt*) o modificada (*mt*). Estos fueron generados por amplificación por PCR de la región codificante de los vectores pQE60g8, pQE60g8/E153A, pQE60g8/K188A, y pQE60g8/H225A, respectivamente. Las reacciones de amplificación contenían Elongasa DNA polimerasa, el vector adecuado y partidores que poseen los sitios de restricción EcoRI y XhoI (Tabla I). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 94 °C por 3 min, 1 ciclo; 94 °C por 1 min, 45 °C por 1 min, 68 °C por 2.5 min, 40 ciclos. Los productos amplificados fueron digeridos mediante la incubación con las enzimas de restricción EcoRI y XhoI, y posteriormente ligados en el vector SP72. El vector de transcripción T7 pGEM-4Z/g11, el cual codifica para NSP5, fue creado mediante la escisión y posterior ligación de un fragmento del vector pBR322g11 (otorgado generosamente por Gerry Both) (Mitchell & Both, 1988). Este fragmento contiene al marco de lectura abierto del gen 11 (que codifica para NSP5). El fragmento fue liberado mediante digestión en presencia de las enzimas HinPI y SacI y posteriormente ligado al

vector pGEM-4Z. Los plasmidios con los correctos incertor fueron verificados mediante secuenciación del DNA.

3. Expresión y purificación de NSP2 y NSP5 recombinantes.-

NSP2 y NSP5 fueron expresadas en *E. coli* M15(pREP4) usando los vectores pQE60g8 y pQE30g11, respectivamente. Las proteínas recombinantes fueron purificadas en condiciones no denaturantes utilizando procedimientos previamente descritos en detalle (Taraporewala et al., 1999, Vende et al., 2002). Básicamente, las proteínas fueron purificadas de lisados bacterianos mediante cromatografía de afinidad usando resina de agarosa unida a nickel-ácido nitrilotriacético (Ni^{2+} -NTA), y posteriormente dializadas. NSP2 fue dializada en buffer LSB (buffer de bajo contenido de sales) (2 mM Tris-HCl (pH 7.2), 0.5 mM EDTA, 0.5 mM dithiothreitol). NSP5 fue dializada brevemente en buffer fosfato (50 mM NaH_2PO_4 (pH 8.0)) y 300 mM NaCl, y posteriormente fue dializada extensivamente en buffer LSB suplementado con 75mM NaCl and 0.1% Triton X-100. La concentración de la proteína fue determinada mediante ensayos de Bradford usando como estándar albúmina de bovino (BSA) y mediante co-electroforesis con cantidades conocidas de BSA en SDS-PAGE al 12% y posterior tinción con azul de Coomassie. La proteína recombinante NSP2 fue purificada prácticamente a homogeneidad usando las condiciones previamente descritas con el fin de cristalizar a la proteína (Jayaram et al., 2002). La purificación de la proteína recombinante NSP5 resulta con la contaminación de trazas de la proteína bacteriana DnaK (<1%) (Vende et al., 2002).



4. Centrifugación Zonal.-

Para verificar la presencia de una forma octamérica en las proteínas modificadas comparable a la proteína silvestre (280 kDa, 10S) (Taraporewala et al., 1999), tanto las proteínas NSP2 *wt* y *mt* como proteínas estándares fueron analizadas individualmente en gradientes de sacarosa al 5-20 % (peso/vol) utilizando tubos cónicos de 12 ml. Las proteínas se diluyeron o resuspendieron en buffer LSB, según sea el caso. Los gradientes se centrifugaron a 200.000 g por 16 hr a 4 °C en un rotor Beckman SWTi. Las proteínas usadas como marcadores o estándares en la gradiente fueron tiroglobulina (650 kDa, 19S), catalasa (250 kDa, 11.3S) y γ -globulina (156 kDa, 7S). Post-centrifugación se colectó fracciones de un 1 ml de la gradiente para observar la presencia de la proteína. Las fracciones se analizaron en geles de poliacrilamida denaturantes (SDS-PAGE) al 12 % y posterior tinción de azul de Coomasie,.

5. Ensayos de hidrólisis de ATP.-

Los ensayos de hidrólisis de ATP para medir la actividad NTPasa en NSP2, en caso que se especifique lo contrario, típicamente contenían la proteína NSP2 *wt* o *mt*, 50mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM MgCl₂, y 10 μ Ci de [α -³²P]ATP (3.000 Ci/mmol) en un volumen final de reacción de 20 μ l. Luego de incubación de 1 hr a 37 °C, los productos de reacción fueron separados mediante cromatografía ascendente de capa fina (TLC) en placas de celulosa PEI-F (Merck) (Taraporewala et al., 1999), visualizados mediante autoradiografía y cuantificados mediante un PhosphorImager. Se generaron marcadores (ADP y AMP) cuando fue necesario, mediante la incubación de [α -³²P]ATP y la pirofosfatasa ácida de tabaco (TAP). Los porcentajes de hidrólisis de ATP fueron

calculados mediante la siguiente formula: % hidrólisis = {cantidad de [α - 32 P]ADP/(cantidades de [α - 32 P] ADP + [α - 32 P]ATP)} X 100. Los valores de hidrólisis de ATP fueron corregidos mediante la resta del valor obtenido de las reacciones en ausencia de proteína. La actividad NTPasa específica (valor de hidrólisis/ μ gr de proteína) representa el promedio de cinco ensayos realizados en paralelo a distintas cantidades de proteína, es decir el promedio de los distintos valores de hidrólisis de ATP divididos por la respectiva cantidad de proteína en el ensayo.

6. Ensayos de fotoentrecruzamiento.-

Las reacciones de fotoentrecruzamiento típicamente contenían 1 μ gr de las proteínas recombinantes NSP2 (28 pmol) *wt* o *mt*, BSA o VP1 (gentilmente provista por la Dra. Alejandra Tortorici), 50mM Tris-HCl (pH 7.5), 20 μ M MgCl₂ y 0.1 μ Ci (4 pmol) de 8-azido-[α - 32 P]-ATP (20 Ci/mmol) (ALT) en un volumen final de reacción de 20 μ l. Las reacciones se incubaron por 5 min en hielo previamente a ser expuestas a luz ultravioleta (UV) por 1.5 min usando una lámpara de luz UV de 254-nm ubicada a una distancia de 3 a 4 cm de la muestra. El análisis de la unión del ATP a la proteína es posible por la formación de un enlace covalente entre el activado grupo azido por la luz UV y un residuo cercado en la proteína. Los productos de la reacción se analizaron mediante SDS-PAGE al 12%, posterior detección por autoradiografía y cuantificación mediante Phosphorimager. El número de moléculas (moles) se calculó mediante la siguiente formula: N° de moléculas de proteína (mol) = cantidad de proteína (gr) / masa molecular (MW) de la proteína (gr/mol).

7. Ensayos de fosforilación *in vitro* de NSP2 y NSP5.-

Los ensayos de fosforilación para NSP2 en caso que no se especifique lo contrario, típicamente contenían 28 pmol de la proteína NSP2 *wt* o *mt*, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM MgCl₂, y 10 µCi de [γ -³²P]ATP (3,000 Ci/mmol) en un volumen de reacción de 20 µl y fueron incubados por 1 hr a 37 °C. Los ensayos de fosforilación para NSP5 contenían 70 pmol de la proteína NSP5, 28 pmol de la proteína NSP2 o alternativamente no NSP2, y los otros componentes descritos en los ensayos de fosforilación de NSP2. Las reacciones se incubaron por 2 hr a 37 °C. Las proteínas NSP2 y NSP5 fosforiladas se detectaron por SDS-PAGE y autoradiografía, y se cuantificaron mediante un PhosphorImager.

8. Estabilidad del enlace fosfoaminoácido en NSP2 bajo condiciones ácidas o alcalinas.-

Reacciones de autofosforilación de NSP2 que contenían 28 pmol de la proteína NSP2 silvestre, se realizaron en las condiciones mencionadas previamente. La proteína caseína quinasa II (CKII) se uso como control de fosforilación, en las condiciones siguientes: reacciones que contenían 500 unidades de CKII (New England BioLabs), buffer caseína quinasa II (CKII) (20 mM Tris, pH 7.5, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂) y 10 µCi de [γ -³²P]ATP (3,000 Ci/mmol) en un volumen de reacción de 20 µl, fueron incubadas por 30 min a 30 °C según instrucciones de fabricante. Las proteínas NSP2 y CKII fosforiladas fueron separadas por SDS-PAGE al 12% y transferidas a membranas de polivinilideno difluoruro (PVDF) (Invitrogen). Las membranas fueron secadas y

expuestas directamente o posterior a una incubación individual por 2 hr a 65 °C en condiciones ácidas (6 M HCl) o alcalinas (1 M KOH).

9. Ensayos de unión a RNA (EMSA).-

La interacción proteína-RNA se estudió mediante ensayos de retardo en la movilidad electroforetica (EMSA). Las proteínas NSP2 *wt* y *mt* (4 pmol) se incubaron en presencia de RNA (10 pmol) marcado con ³²P en buffer LSB en un volumen de reacción de 10 µl por 30 min a temperatura ambiente. Las reacciones se analizaron mediante electroforesis en geles no denaturantes (geles de poliacrilamida al 6% con 50 mM Tris-HCl y 50 mM glicina (pH 8.8)) por 3 hr a 175 Volt. Los complejos proteína-RNA se detectaron por autoradiografía y las bandas se cuantificaron por Phosphorimager.

La preparación de la sonda de RNA de setenta y dos nucleótidos de largo (72 mer), se realizó siguiendo procedimientos previamente descritos (Taraporewala et al., 1999). Brevemente, la sonda se sintetizó mediante transcripción *in vitro* usando el sistema de la polimerasa del fago T7 (Ambion MAXIscript system) en presencia de [α -³²P]UTP (50 µCi). Se utilizó como templado el plasmidio SP72v40. El templado de DNA previamente a ser utilizado en la transcripción, fue linearizado por digestión con SacII y tratado con la polimerasa T4. La reacción de transcripción se realizó siguiendo las indicaciones otorgadas por el fabricante del kit, a excepción que se disminuyó la presencia de UTP no marcado a un cuarto de lo indicado en 20 µl de reacción. Luego de la reacción, las moléculas de RNA se purificaron por extracción en fenol-cloroformo y posterior precipitación en isopropanol. Finalmente se realizó una purificación por gel mediante electroforesis en geles denaturantes de poliacrilamida al 6%-7 M urea. La

concentración del RNA luego de la elución del gel, posterior extracción y precipitación, se calculó midiendo la absorbancia del RNA a 260 nm.

10. Ensayos de expresión transiente *in vivo* de NSP2 y NSP5.-

Monocapas celulares casi confluentes de células MA104 fueron infectadas con rotavirus SA11 a una MOI de 10. Una hora post infección (p.i.) el inóculo fue reemplazado con medio 199 y las células fueron incubadas por 8 h mas antes de ser utilizadas para la microcopia por inmunofluorescencia. Para expresar transientemente NSP2 y NSP5 *in vivo*, células MA104 fueron infectadas con virus vacuna (vaccinia) recombinante vTF7.3 (Fuerst et al., 1986) a una MOI de 10. El inóculo fue retirado 1 h p.i. y reemplazado por la mezcla de transfección que contiene Lipofectamina (Invitrogen) al 4% y 1 µgr de uno o mas de los plasmidios de transcripción T7 que codifican para la expresión de NSP2 y/o NSP5. Las células posteriormente se procesaron para inmunofluorescencia a las 16 h p.i.

11. Inmunofluorescencia.-

Células infectadas con rotavirus o transfectadas con los plasmidios de expresión fueron lavadas con PBS, fijadas con formaldehído al 4 % en PBS por 1 hr a temperatura ambiente, y lavadas nuevamente con PBS. Las células fueron posteriormente incubadas en PBS que contiene BSA libre de γ -globulina por 15 min a temperatura ambiente y lavadas con PBS con Triton X-100 al 1%. Las células luego fueron incubadas con el anticuerpo policlonal de cobayo anti-NSP2 (Taraporewala et al., 1999) y/o con el monoclonal murino anti-NSP5 (158G37) (Poncet et al., 1997), a una dilución de ambos

de 1:1.000 en PBS-BSA al 3% por 1.5 hr. Las células posteriormente se lavaron sucesivamente en PBS-Triton X-100 al 1%, PBS-Triton X-100 al 1% y PBS-BSA al 3%, y finalmente PBS-Triton X-100 al 1%. Los anticuerpos secundarios de caprino conjugados con los fluoroforos, Alexa Fluor 488 anti-cobayo IgG y Alexa Fluor 594 anti-ratón IgG (Molecular Probes), se incubaron con las células a una dilución de 1:1.000 en PBS-BSA al 3% por una hora y media. Subsecuentemente las células se lavaron con PBS-Triton X-100 al 1 % y PBS, e incubaron en PBS-BSA al 3% 0.1 M glicina por 10 min, posteriormente se incubaron en el mismo buffer en presencia de 6 µgr/ml de Hoechst 33258 o DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole, Pierce) por 10 min para la tinción del núcleo. Posteriormente se realizaron lavados sucesivos en PBS-Triton X-100 al 1% y PBS. La fluorescencia fue detectada con luz UV laser en un microscopio confocal invertido Leica TCS NT (Coherent, Santa Clara, CA). Las imágenes individuales obtenidas fueron superpuestas utilizando el programa Adobe PhotoShop Version 5.5.

12.- Marcación radioactiva in vivo de NSP2 y NSP5.-

Células MA104 fueron infectadas a una MOI de 10 con rotavirus SA11. Luego de la primera hr p.i. el inculo fue reemplazado por medio 199. A las 8 h p.i. el medio se reemplazó por medio mínimo esencial libre de Cys y Met o libre de fosfato. El medio mínimo posteriormente (9^{na} h p.i.) fue reemplazado por medio mínimo esencial libre de Cys y Met suplementado con 25 µCi de [³⁵S]metionina/ml (>1.000 Ci/ml, PerkinElmer Life Sciences) o por medio mínimo esencial Dulbecco suplementado con 25 µCi de [³²P]ortofosfato/ml (9.000 Ci/mmol), según sea el caso. Luego de incubación por 3 h, las células fueron lisadas en 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 137 mM NaCl, 10% glicerol, 1%

Nonidet P-40, 2 µgr de aprotinina/ml y 0.5 µgr de leupeptina/ml. Los lisados celulares se clarificaron por centrifugación a 10.000 x g por 2 min. En el caso de las células infectadas por vaccinia y co-transfectadas con los plásmidos, estas se marcaron a las 14 h p.i. con [³⁵S]metionina o [³²P]ortofosfato y fueron tratadas siguiendo el mismo procedimiento descrito recientemente.

13. Simulación Molecular.-

Las coordenadas de la estructura de NSP2 (código PDB: 1L9V) obtenida por la cristalografía y difracción de rayos X, fue usada para todos los cálculos. Los átomos de hidrogeno de la proteína se asignaron mediante el programa *CHARMm* (Version 27) (Brooks et al., 1983) y posteriormente se minimizó la energía usando un protocolo de "simulated annealing" (SA). El protocolo de SA usado consistió en 500 picosec (ps) con una temperatura inicial y final de 450° y 200° kelvin (K), respectivamente. La temperatura fue disminuida en pasos de 5° K cada 10 ps. Durante esta simulación el resto de los átomos de la proteína no-hidrógenos, fueron restringidos. Los cálculos fueron realizados utilizando una constante dieléctrica dependiente de distancia de 80 (simulando a un solvente acuoso). El programa *Autodock 3.02* (Morris et al., 1998) se utilizó con la estructura minimizada de NSP2 para simular la unión (docking) de la molécula de ATP. Las representaciones de la proteína y el ligando fueron creadas usando el programa *Insight II* (Accelrys, 1997). Las cargas parciales fueron asignadas usando un campo de valencia CVFF (Consistent Valence Force Field). Las moléculas de agua estructurales fueron removidas para facilitar el calculo computacional. Parámetros atómicos de solvatación y volúmenes fragmentales fueron asignados a la proteína por el programa

Addsol. Los mapas de grilla para la simulación de la unión del ATP fueron calculados usando el programa *Autogrid* y fueron centrados alrededor del posible sitio de unión del ligando (hendidura de NSP2). El volumen escogido para los mapas de grilla fue de 81 x 81 x 81 puntos con un espaciamiento de grilla de 0.375 Å. El programa *Autotors* fue usado para definir los enlaces rotatorios del ATP. Para la simulación de la unión del ATP, los enlaces entre los átomos P β -O3B y P γ -O3B fueron restringidos de libre movimiento, con el fin de emular la conformación del ATP cuando se encuentra unido al Mg²⁺. El algoritmo genético Lamarckiano (LGA) fue usado en todos los cálculos de unión de ligando.

Las dos posiciones de unión del ATP de mas baja energía predecidas durante el acoplamiento (cada una en posición opuesta), fueron utilizadas para crear dos complejos separados NSP2-ATP-Mg²⁺. La posición del Mg²⁺ en ambos complejos fue posicionada entre los átomos O3G y O1B del ATP, OH de la Tyr171, y OE2 del Glu153. Esta posición esta de acuerdo con los datos preliminares obtenidos en la cristalización de la estructura (Jayaram et al., 2002). Los complejos fueron minimizados usando ciclos cortos y alternados de dinámica molecular (DM) (3 ps) y minimización. Finalmente, se realizó una simulación extensa por DM de 1 ns antes del análisis de las interacciones ligando-proteína en cada complejo.

14. Secuencias de NSP2 utilizadas en el alineamiento.-

El número de acceso del banco de genes (GenBankTM) (<http://www.ncbi.nih.gov/Genbank/index.html>) de las secuencias utilizadas en el alineamiento son: 1L9V (simian SA11 4F), Q03245 (Human WA), P09366 (porcine Osu), BAA84967 (Human KU),

P03538 (bovine UK), Q03244 (avian TY-1), BAA24142 (avian PO-13), S25545 (Bovine B11), CAB52753 (Human Bristol (Brist)), AAF72868 (Human CAL1), U03558 (IDIR), y AAA47328 (ADRV). Los alineamientos se realizaron usando el programa *ClustalW 3.0* (<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/>) y posteriormente se editaron en el programa *BOXSHADE 3.21* (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html).

RESULTADOS

1. Motivo tipo-HIT en NSP2.-

La hendidura profunda de 25Å formada por los dominios C- y N-terminal de NSP2 de rotavirus SA11, ha sido propuesta como el sitio de hidrólisis del NTP (Fig. 8, A y B). En esta región, H221 fue postulada como la primera histidina de la tríada catalítica basado en la superimposición de estructuras con la histidina (H110) de PKCI. La histidina H225 en NSP2 fue propuesta como la segunda histidina de la tríada y, posiblemente, como la histidina que realiza el ataque nucleofílico al fosfato gamma del NTP (Jayaram et al., 2002). El alineamiento de las secuencias aminoacídicas de la proteína NSP2 de rotavirus correspondientes a los grupos A, B y C, denota la conservación de los residuos que están presentes en la hendidura a pesar de que existe una baja similitud e identidad aminoacídica general (32% y 17% entre NSP2 del grupo A y B, y 55% y 34% entre NSP2 del grupo A y C; respectivamente). La conservación de un grupo de aminoácidos en la vecindad de H225 sugiere la presencia de un motivo, ²²¹H-G-(K/H)-X-²²⁵H-X-R-X-V, en la hendidura que puede participar en la unión e hidrólisis del NTP (Fig. 9). Ciertamente, la presencia de residuos básicos en este bloque de conservación (H221, K/H223, H225 y R227) como en sus alrededores (K188, H/K110), imparten un potencial electropositivo en la superficie de la hendidura que la hace adecuada para la unión del nucleótido. Rodeando al motivo también se encuentran residuos conservados de naturaleza hidrofóbica (L111, I/V157, V158, M/I167, I/M220, V229, L/V234), los cuales participarían mayormente en mantener la integridad estructural de la hendidura. En la base de la hendidura se encuentran también los residuos E153 y Y171. Estos aminoácidos son conservados y han sido postulados como los

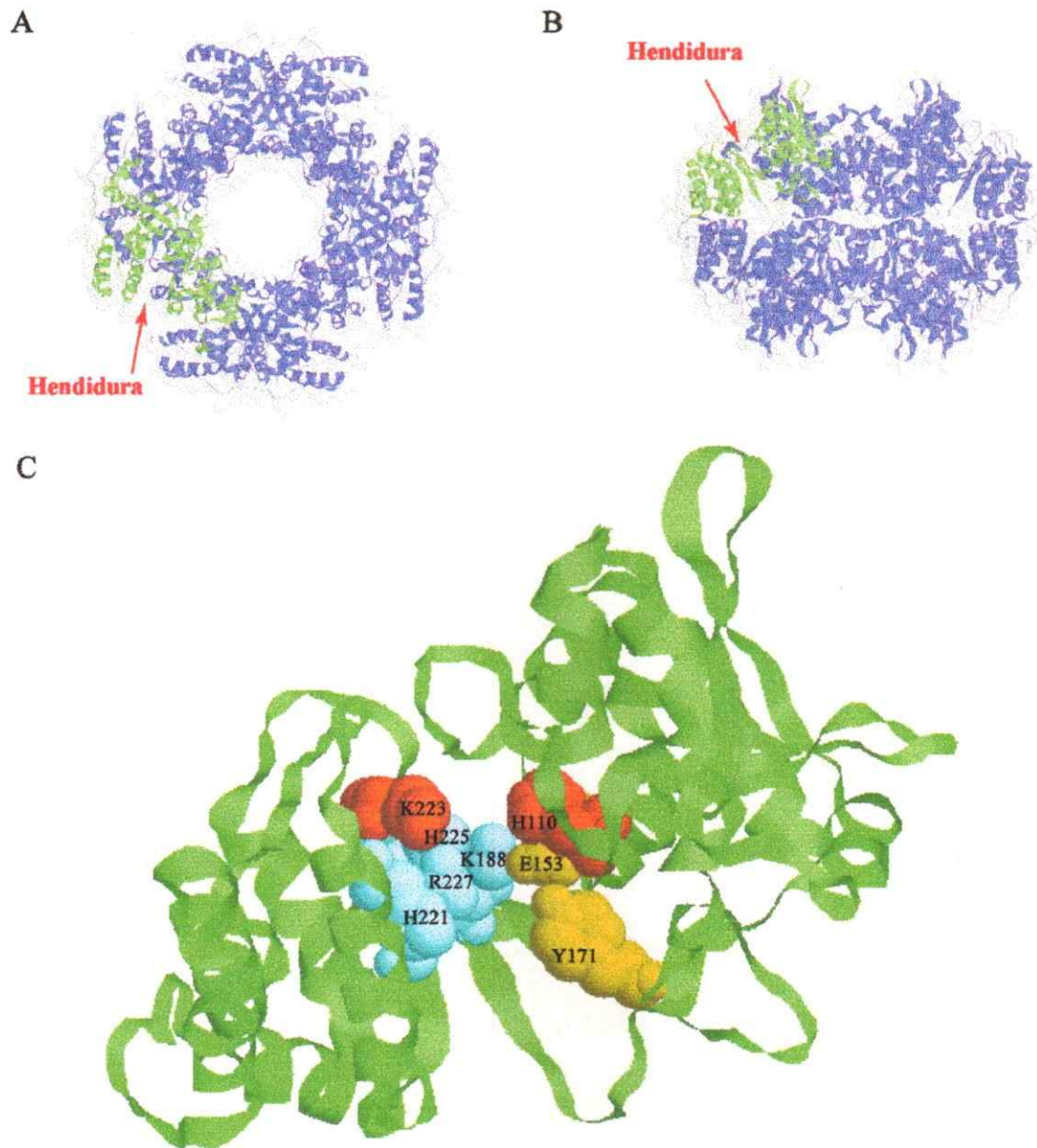


Figura 8. Aminoácidos seleccionados para la modificación sitio dirigida en NSP2. *A* y *B*, la hendidura en NSP2, sitio propuesto de unión e hidrólisis de los NTPs, se encuentra señalada con una flecha en uno de los monómeros del octámoro de NSP2, en una vista del eje de 4 o 2 simetrías (*A* y *B* respectivamente). *C*, acercamiento de la vista del monómero (*B*) que muestra los posibles aminoácidos implicados en la unión y/o hidrólisis del NTP (rojo y celeste), y en la coordinación al Mg^{2+} (amarillo). Estos residuos fueron seleccionados para la modificación sitio dirigida.

aminoácidos que coordinarían al ion Mg^{2+} en base a ordenes de densidad presentes en la estructura de NSP2 (Jayaram et al., 2002).

2. Selección de los residuos para modificación sitio-dirigida en NSP2.-

Con el fin de determinar el sitio catalítico de la enzima y la contribución de esos residuos para la actividad de NTPasa, se seleccionaron diversos residuos para modificación sitio-dirigida. La selección de los residuos se realizó tanto en base a la predicción realizada en el análisis de la estructura de la proteína (Jayaram et al., 2002), como en base al grado de exposición al solvente de los residuos en la hendidura (Fig. 8C) y al grado de conservación en los distintos grupos de rotavirus (Fig. 9). Estos residuos, H110, E153, Y171, K188, H221, K223, H225 y R227, fueron modificados independientemente por alanina. Las proteínas que contienen la modificación son indicadas en letras itálicas para facilitar lectura (ejemplo: *H110A*). La expresión y purificación de las proteínas modificadas fue realizada siguiendo las técnicas previamente descritas y establecidas para la proteína silvestre (*wt*) (Taraporewala et al., 1999). Con el fin de determinar que se mantuviera la forma octamérica de la proteína, las proteínas modificadas (*mt*) así como la silvestre se analizaron por medio de centrifugación zonal en gradientes de sacarosa (Taraporewala et al., 1999). Las propiedades de sedimentación de las proteínas modificadas de NSP2 fueron indistinguibles a la *wt*, migrando como especies definidas con un coeficiente de sedimentación de 10S en gradientes de sacarosa 5-20%. Esto permitió confirmar que el plegamiento de la proteína no fue afectado por las modificaciones y por lo tanto descartar la posibilidad que las proteínas modificadas se

encuentren afectadas en su actividad NTPasa debido a falta de la estructura octamérica, que es la forma funcional de la proteína.

3. Los residuos E153, Y171, K188, H221, H225 y R227 son críticos para la actividad NTPasa.-

La proteína NSP2 posee una actividad NTPasa dependiente de Mg^{2+} que hidroliza el enlace fosfoanhidro γ - β de los cuatro NTPs con una eficiencia similar (Taraporewala et al., 1999). Con el fin de comparar la actividad NTPasa, tanto la proteína silvestre como las modificadas se incubaron con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP y $MgCl_2$ por una hora a 37°C . Los productos de hidrólisis se separaron por cromatografía de capa fina (TLC) y se identificaron mediante autoradiografía (Fig. 10A). La actividad NTPasa específica promedio para cada proteína modificada fue determinada y posteriormente normalizada respecto a la obtenida por la proteína *wt* (ver *mat.* y *met.*). Los resultados obtenidos muestran que varias de las proteínas modificadas de NSP2 se encuentran afectadas en la actividad NTPasa (Fig. 10B). Dependiendo del grado en que la actividad NTPasa se encontró afectada, las proteínas modificadas se agruparon básicamente en tres grupos: severamente afectadas (los cuales presentan una disminución de más del 90% de su actividad NTPasa comparados a la proteína *wt*), es decir las proteínas *E153A*, *Y171A*, *K188A*, *H221A*, *H225A*, y *R227A*; moderadamente afectadas (que presentan una disminución de al menos 75% de la actividad NTPasa), es decir *K223A*; y mínimamente afectadas (que presentan una disminución del 25% de la actividad NTPasa), es decir *H110A*. La modificación en cualquiera de las dos histidinas (His221 y His225) postuladas como las primeras dos de la tríada, o en los aminoácidos básicos cercanos a esta (Lys188

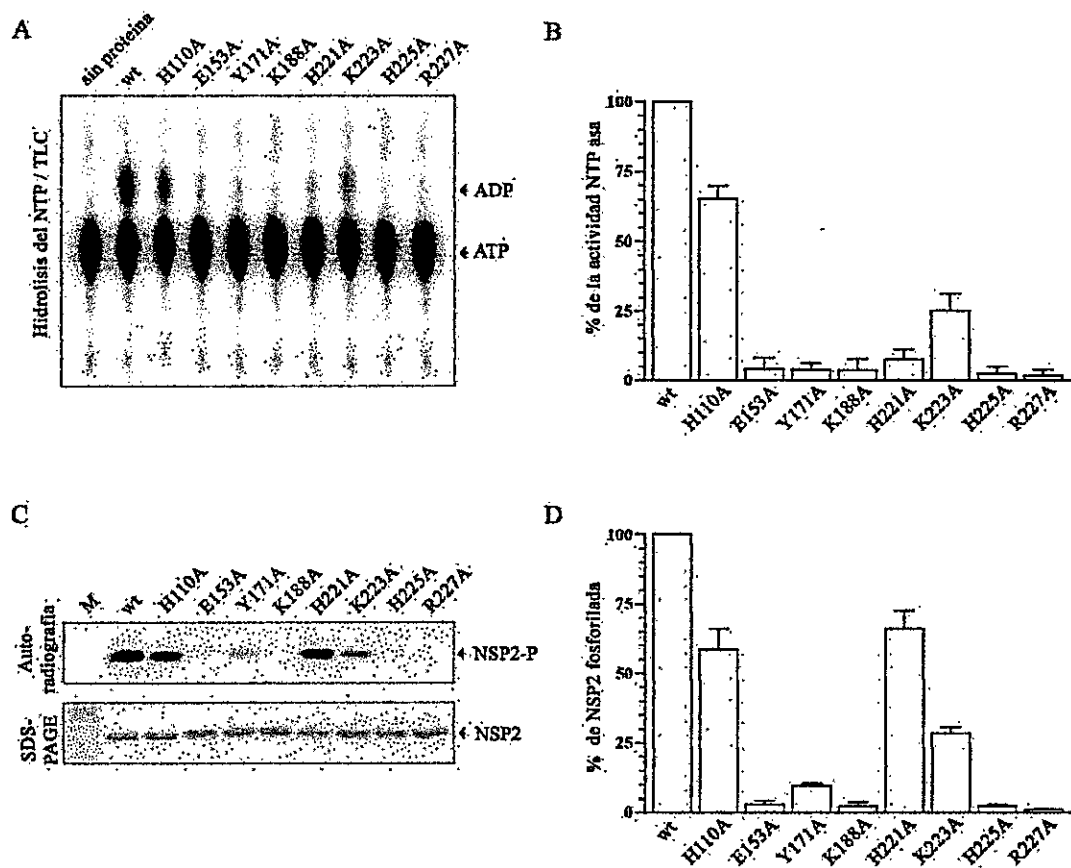


Figura 10. Actividad NTPasa y autofosforilación de las distintas proteínas modificadas de NSP2. *A*, la formación de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ADP}$ en las distintas reacciones fue detectada mediante TLC y autoradiografía. Las reacciones contenían 10 μCi de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ y 28 pmol de NSP2 *wt* o *mt*. La reacción control se realizó en ausencia de proteína. *B*, las distintas cantidades de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ADP}$ obtenido en presencia de cinco cantidades distintas de proteína (14, 28, 56, 84, y 112 pmol) se detectaron y cuantificaron por PhosphorImager, posteriormente con los valores obtenidos se calculó la actividad NTPasa específica de la proteínas *wt* y *mt*. El promedio de los valores correspondientes a dos ensayos independientes se reportan como porcentaje de los valores obtenidos para la proteína *wt*. *C*, las proteínas presentes en las reacciones de autofosforilación (28 pmol de NSP2 *wt* o *mt* y 10 μCi de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$) se detectaron mediante SDS-PAGE y tinción por azul de Coomassie. NSP2 fosforilada (NSP2-P) se detectó por autoradiografía (*C*) y se cuantificó mediante PhosphorImager. *D*, los valores correspondientes a tres experimentos independientes fueron cuantificados, promediados y normalizados respecto al valor obtenido para la proteína *wt*. Las barras de error representan a la desviación estándar de los diferentes valores obtenidos. *M*, representa al marcador de peso molecular.

y Arg227), o en los dos posibles aminoácidos que coordinan el ion Mg^{2+} , produce una pérdida dramática de la actividad NTPasa (Fig. 10B). Por lo tanto se han identificado residuos requeridos para una eficiente hidrólisis del NTP y críticos para la actividad NTPasa.

La modificación en los residuos His110 y Lys223 tiene como resultado proteínas que poseen 65% y 25% de actividad NTPasa comparada a la proteína *wt*, respectivamente. Esto sugiere que estos residuos no están directamente involucrados en la hidrólisis de la molécula de NTP. En comparación a los aminoácidos Glu153, Tyr171, Lys188, His221, His225, y Arg227 que se encuentran completamente conservados en los distintos grupos de rotavirus (A, B, y C), la His110 y Lys223 se encuentran conservadas solamente en el grupo A y C, ya que en el caso del grupo B el residuo equivalente a la His110 es una lisina y el residuo equivalente a la Lys223 es una histidina (Fig. 9). El hecho que la His110 y la Lys223 estén sustituidas en el grupo B por aminoácidos básicos sugiere que existe una conservación de carga, la cual contribuiría para una actividad NTPasa óptima.

4. Modelación y simulación de la unión de la molécula de ATP en NSP2.-

Con el fin de obtener información acerca de la interacción de la molécula de NTP y NSP2, se utilizó una estrategia computacional de múltiple acoplamiento de ligando. Esto fue posible mediante el uso del programa *Autodock 3.02*, el cual utiliza algoritmos para la simulación de unión del ATP a la proteína (docking). Los resultados entregados por el programa muestran las 10 mejores posiciones de unión (de mas baja energía) de la molécula de ATP en la proteína. En el caso de NSP2, ocho de las 10 posiciones predicen

la unión del ATP hacia un extremo de la hendidura, mientras que solo dos predicen la unión en sentido opuesto al anterior (Fig. 11, A y B). Ambas posiciones aunque difieren en cerca de 180° respecto a la posición de la ribosa y la base nitrogenada, presentan una sobreposición en los fosfatos del nucleótido. En cada una de estas posiciones el ATP está unido a una área definida en lo profundo de la hendidura, resultado que es consistente con las predicciones del análisis estructural (Jayaram et al., 2002). Esto es notable debido a que si se toma en cuenta la naturaleza altamente electropositiva en la que se encuentra la hendidura (Fig. 12), la unión del ATP podría haber sido predecida en múltiples lugares de esta área, pero en contraste la localización fue bastante definida, en especial la de los fosfatos.

En un segundo paso de la modelación molecular, se crearon dos complejos NSP2-ATP-Mg²⁺ (modelo I y II) tomando en cuenta las dos orientaciones opuestas de menor energía predecidas en el acoplamiento. Estos complejos fueron analizados luego de realizarse una simulación molecular en el programa *CHARMm* (Fig. 11, C y D). En la simulación molecular se utilizó un protocolo conjunto de dinámica molecular (MD) y minimización. La metodología de simulación usada en este caso básicamente perturba al sistema en busca de estados de mejor energía tanto local (sitio de unión del ligando) como global (proteína y su entorno), llegando al final de la simulación a un sistema estable (en equilibrio) del complejo NSP2-ATP-Mg²⁺. La simulación es un proceso iterativo de optimización que permite tener una idea de las posibles interacciones (puentes de hidrógeno, interacciones tipo coulombicas y de Van Der Waals) que se crean entre los átomos del ligando y los átomos de los aminoácidos circundantes más próximos a este. En resumen, la simulación nos permite identificar que posibles aminoácidos

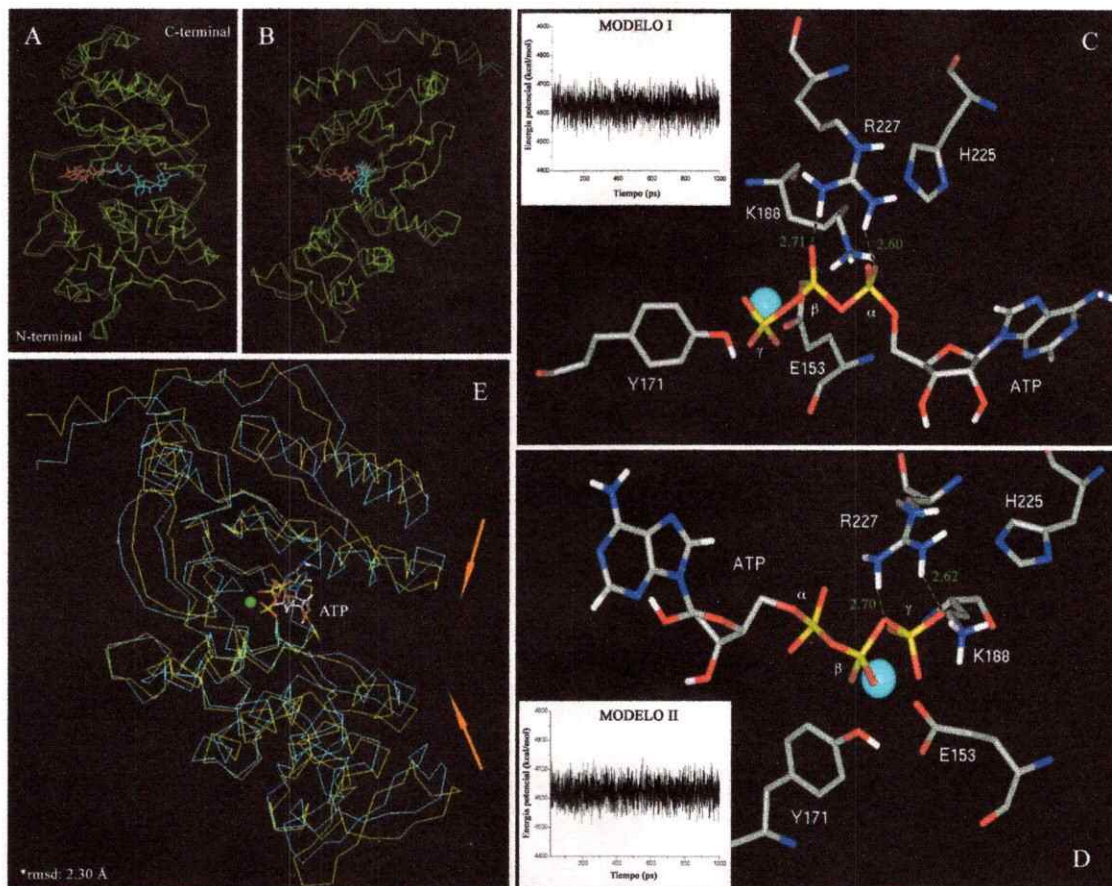


Figura 11. Simulación de la unión del ATP a la proteína NSP2. Se observa los resultados de la simulación molecular de dos complejos NSP2-ATP-Mg²⁺ creados mediante el programa *INSIGHT II* posicionando las dos mejores orientaciones del ATP predecidas por el programa *Autodock 3.02*. **A**, Los dos modelos fueron superimpuestos para mostrar las dos posibles orientaciones del ATP (rojo y celeste) en la hendidura del monómero. **B**, Rotación de 90° sobre el eje *Y* de los modelos mostrados en **A**. **C** y **D**, representan acercamientos de las dos posibles posiciones de unión del ATP en la hendidura (Modelos I y II, respectivamente). Los modelos representan a los complejos NSP2-ATP-Mg²⁺ después de simulación molecular de 1 ns realizada en el programa *CHARMM*. La energía potencial de cada complejo indicando la estabilización del sistema durante la simulación es mostrada en los paneles internos de cada figura (**C** y **D**). El ion Mg²⁺, de color celeste, fue posicionado previo a la simulación. Los números denotan la distancia en Angstroms de los posibles puentes de hidrógenos formados al final de la simulación. **E**, Cierre de la hendidura después de la unión del ATP. La conformación cerrada al final de la simulación con el ATP unido (color celeste) fue superimpuesta a la conformación abierta de la proteína sin el ATP (color amarillo). *rmsd (root-meansquare deviation) denota el movimiento de los carbono α de la proteína al final de la simulación respecto a la estructura de referencia previa a la simulación (estructura cristalizada).

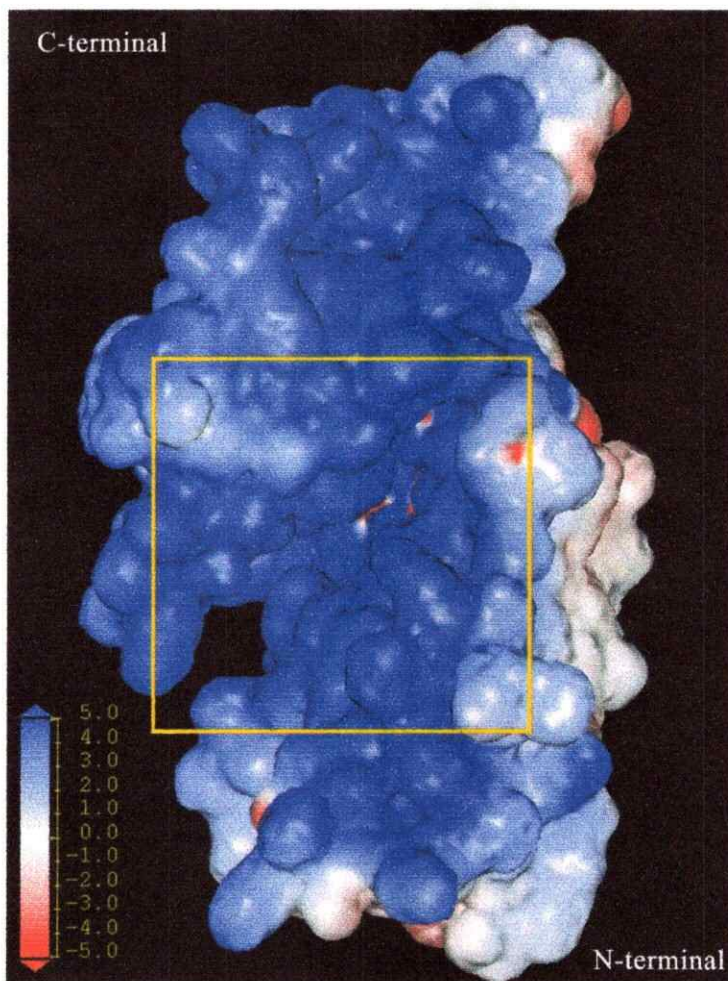


Figura 12. Naturaleza electropositiva de la hendidura de NSP2. La hendidura profunda presente en NSP2 se encuentra en un ambiente altamente electropositivo de la proteína. El cálculo del potencial electrostático fue realizado mediante el programa *DELPHI* y posteriormente se visualizó en *INSIGHT II*. El área que corresponde a la hendidura está delimitada por el cuadro de color amarillo. La barra en la izquierda inferior de la figura muestra el color asignado para cada valor del potencial (rojo – electronegativo, azul – electropositivo y blanco - neutro).

podrían participar de una manera importante en la unión e hidrólisis de la molécula de NTP. La diferencia primordial de esta estrategia computacional respecto a la de acoplamiento, es que en este caso el sistema completo está libre de interactuar entre sí en busca de un mejor estado, ya que en el caso del anterior la proteína se encuentra en un estado rígido en el cual se busca la mejor posición de unión del ATP para esa conformación. Otra de las diferencias es que en este análisis se toma en consideración al Mg^{2+} , ya que en el caso del acoplamiento éste se realiza sin la presencia del ion. El ion Mg^{2+} fue posicionado previo a la simulación entre las cadenas laterales de los aminoácidos E153 y Y171, los que se postulan como los residuos que acompañan al ion debido a los datos cristalográficos preliminares (ordenes de densidad) y a que también estos se encuentran a una correcta distancia y geometría entre ellos para realizar la función. La energía potencial (E_P) obtenida al final de la simulación (ya en la estabilización de los sistemas) para cada uno de los complejos NSP2-ATP- Mg^{2+} es muy similar, presentando valores de E_P de 4620 y 4623 kcal/mol, para el modelo I y II, respectivamente (Fig. 11, C y D). Esto indica que ambos sistemas llegaron a un nivel de interacciones similares tanto de la proteína misma y su entorno, como la proteína con el ligando. Los resultados de la simulación para cada uno de los complejos NSP2-ATP- Mg^{2+} , muestran a los mismos aminoácidos (K188, H225, R227) en cercanía e interactuando con los fosfatos de la molécula de ATP. Estos resultados son notables si se toma en cuenta la orientación contraria de las moléculas de ATP en cada complejo. Sin embargo ambos modelos presentan diferencia respecto a la interacción con los fosfatos, en el caso del modelo I, el grupo ϵ -NH₂ del residuo K188, el grupo N ϵ 2 de la H225, y el grupo guanidino de la R227 están posicionados próximos al fosfato α y β del ATP (Fig.

11C), mientras que en el caso del modelo II estos mismos grupos se encuentran próximos al fosfato y del ATP (Fig.11D). En conjunto los resultados obtenidos en ambos modelos sugieren que los aminoácidos K188, H225, y R227 representan residuos críticos ya sea para la unión o para la hidrólisis de la molécula de NTP. Estos resultados obtenidos por una aproximación computacional (modelación molecular) son consistentes con los resultados obtenidos en la aproximación experimental (bioquímica - ensayos de hidrólisis de ATP), los cuales muestran que la mutación en cualquiera de los residuos K188, H225, o R227 da como resultado proteínas que carecen de actividad hidrolítica (Fig. 10B).

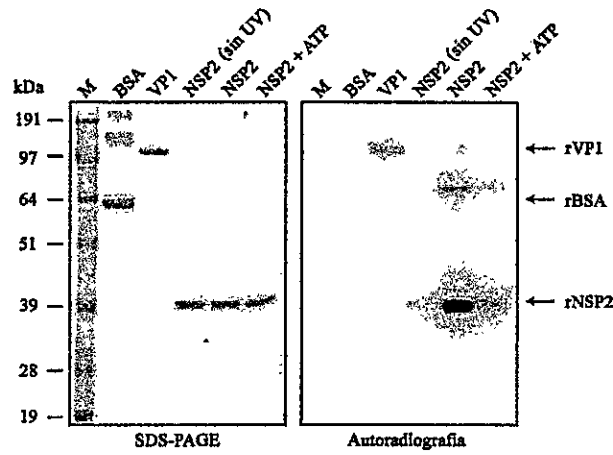
El análisis de los complejos NSP2-ATP-Mg²⁺ obtenidos al final de la simulación indican también la presencia de un cambio estructural de la proteína luego del posicionamiento del ATP. En ambos modelos se produce un movimiento de la cadena de los carbonos α de la proteína hacia la molécula de ATP, presentando una distancia de movimiento o "root mean square (rms) distance" de 2.30 y de 2.04, para el modelo I y II, respectivamente. Este movimiento se traduce en un cierre parcial de la hendidura en la presencia de la molécula de ATP (Fig. 9E). El efecto observado concuerda con estudios experimentales previos realizados mediante ultracentrifugación analítica (AU), en los cuales se observa que los octámeros presentan una forma más compacta en presencia de nucleótidos; como también mediante diroísmo circular (CD), donde se observa un cambio parcial en la estructura secundaria también en la presencia de los NTPs (Schuck et al., 2001). Notablemente no solo se observa un movimiento de la cadena α de la proteína hacia el ATP unido, sino también de las cadenas laterales de los residuos más próximos (K188, H225 y R227). Estos resultados sugieren que la unión del ATP gatilla

un cambio conformación de la proteína traduciéndose en un aumento de la afinidad por el ligando, pudiendo existir un mecanismo de adaptación de la enzima al ligando o “induced fit mechanism”.

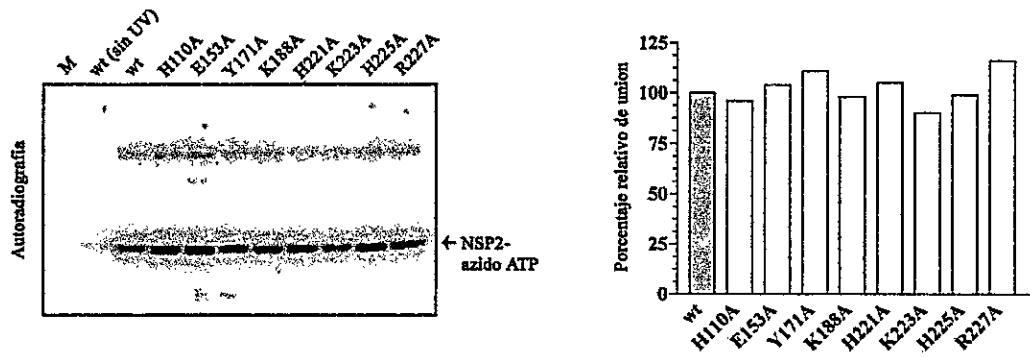
5. Unión del ATP a la proteína NSP2.-

La actividad NTPasa esta constituida básicamente por dos eventos: a) unión y b) posterior hidrólisis del nucleótido trifosfato. Con el fin de estudiar la unión del ATP a la proteína NSP2 de una manera experimental, proteínas NSP2 silvestre y modificadas como proteínas control se incubaron en presencia del análogo fotoreactivo [α - 32 P] 8-azido ATP y $MgCl_2$ por 5 min en hielo previamente a la exposición de luz UV. Las proteínas marcadas en la fotoreacción fueron separadas mediante electroforesis denaturante (SDS-PAGE), visualizadas por autoradiografía y cuantificadas mediante un PhosphorImager. Los resultados observados en la Fig. 13A, muestran que la proteína NSP2 es una proteína que une ATP. En el caso de las proteínas modificadas, ninguna presenta una diferencia significativa en la unión del nucleótido en comparación a la proteína *wt* (Fig. 13B). Los resultados sugieren que si bien alguno de los aminoácidos modificados participa en la unión del nucleósido trifosforado, este no es el único determinante en la unión del ATP a la proteína. Una serie de estudios muestran que es necesaria la modificación simultánea en mas de un aminoácido o alternativamente la deleción de un segmento de la proteína con el fin de anular la unión del NTP (McIntosh et al., 2003, McIntosh et al., 1996).

A



B



C

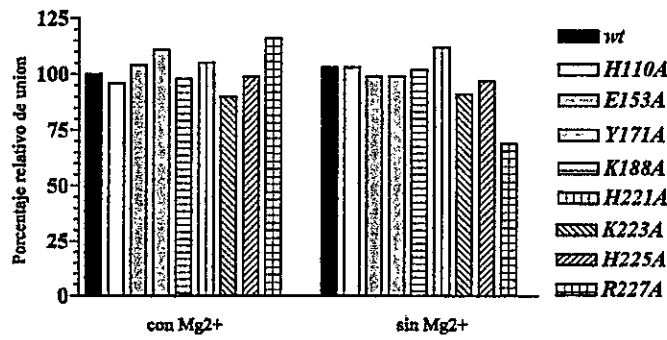


Figura 13. NSP2 es una proteína que une ATP. *A*, Reacciones que contienen 1 μ g de NSP2 *wt* (28 pmol) o de VP1 o BSA y 4 pmol de 8-azido- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ se incubaron en hielo por 5 min previo a ser expuestas a luz UV. Las proteínas se identificaron mediante SDS-PAGE al 12% y posterior tinción por azul de Coomassie. La unión del ATP a las proteínas se identificó por autoradiografía. En el caso de la reacción NSP2 + ATP, se agregó un exceso de ATP no marcado (100 X) pre-incubación con la proteína. *B*, Reacciones que contienen 28 pmol de NSP2 *wt* o *mt* y 4 pmol de 8-azido- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ se incubaron y trataron como se indicó previamente. La unión del ATP a las proteínas se detectó mediante SDS-PAGE y autoradiografía (*izquierda*), y fueron cuantificadas mediante PhosphorImager (*derecha*). La unión del ATP en presencia de la proteína *wt* fue definida como 100%. *C*, Reacciones similares a las descritas previamente en (*B*), se realizaron en presencia o ausencia de Mg^{2+} y fueron analizadas mediante SDS-PAGE y PhosphorImager. Similar al caso anterior (*B*), la unión del ATP en presencia de la proteína *wt* y Mg^{2+} fue definida como 100%.

Diversos estudios demuestran que el ion Mg^{2+} puede tener un efecto notorio de la unión del nucleótido a la proteína (Clausen et al., 2003, Lima et al., 1997, McIntosh et al., 2003), con el fin de poder determinar si la presencia o ausencia de Mg^{2+} producía una diferencia notable en la unión del NTP en alguno de las proteínas modificadas, especialmente las deficientes en su actividad NTPasa, se realizaron ensayos similares al descrito previamente en los cuales la variante fue la presencia o ausencia del cation bivalente. Los resultados obtenidos indican que la ausencia de Mg^{2+} no produce una diferencia significativa con respecto a la presencia del ion en la unión del NTP a las proteínas modificadas (Fig. 13C). Los resultados obtenidos llevaron a realizar la siguiente pregunta: ¿Como participa el ión Mg^{2+} en la unión e hidrólisis del NTP? y por lo tanto a re-definir su rol en estos dos eventos.

6. Requerimiento del ion Mg^{2+} para la unión e hidrólisis del ATP.-

El ion Mg^{2+} es necesario como cofactor en la actividad NTPasa de NSP2 (Taraporewala et al., 1999). El Mg^{2+} puede ser sustituido por Mn^{2+} , aunque la velocidad de hidrólisis es menor. El rol que estos cationes cumplen en la reacción puede ser tanto a nivel del primer evento de la reacción (unión) como a nivel del segundo (hidrólisis), siendo común también que el ion sea necesario en ambos eventos (Clausen et al., 2003, Lima et al., 1997, McIntosh et al., 2003, Ozvegy et al., 2002). Con el fin de dilucidar cual de los eventos es dependiente de la presencia del ion Mg^{2+} en la actividad NTPasa, la proteína NSP2 silvestre se incubó en presencia de cantidades similares de $[\gamma-^{32}P]ATP$ o $[\alpha-^{32}P]$ 8-azido ATP y distintas concentraciones de Mg^{2+} por 1 hr a $37^{\circ}C$ o por 5 min en hielo (previa a la exposición de luz UV), respectivamente. Las reacciones que contenían

$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ fueron analizadas tanto para observar la hidrólisis de ATP (TLC) como para observar la autofosforilación de la proteína (SDS-PAGE); mientras que las reacciones que contenían $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ 8-azido ATP fueron analizadas para observar la unión del NTP a la proteína (SDS-PAGE). Los resultados obtenidos muestran que el ion Mg^{2+} es requerido principalmente en la hidrólisis del nucleósido trifosfato y no en la unión de este a la proteína (Fig. 14). En los resultados se observa que a altas concentraciones del ion ambos eventos se ven afectados, en especial la unión del nucleótido, esto puede deberse a diversas razones, entre las cuales se encuentran por ejemplo a que aumentan los iones cloruros, los que pueden ocupar al hendidura e inhibir la unión del nucleótido a altas concentraciones; o alternativamente como se ha descrito previamente que altas concentraciones del ion Mg^{2+} son adversas para la estructura del octámero produciéndose la separación de este en dos tetrameros. Notablemente, en la ausencia de Mg^{2+} se observa la unión del nucleótido a la proteína, sin embargo la presencia de bajas concentraciones del cation mejora la unión del ATP. Finalmente, en los resultados también se puede observar que la hidrólisis del ATP y la autofosforilación de la proteína presentan un comportamiento muy similar a las distintas concentraciones del ion Mg^{2+} , lo cual es un indicativo de la estrecha relación entre los dos fenómenos.

7. Hidrólisis del ATP y autofosforilación de NSP2.-

La actividad NTPasa resulta en la autofosforilación de la proteína vía la formación de un enlace covalente entre el liberado fosfato y del NTP y la proteína (Taraporewala et al., 1999). Con el fin de entender la relación entre la actividad NTPasa y la autofosforilación de la proteína, tanto la proteína silvestre como las modificadas, se

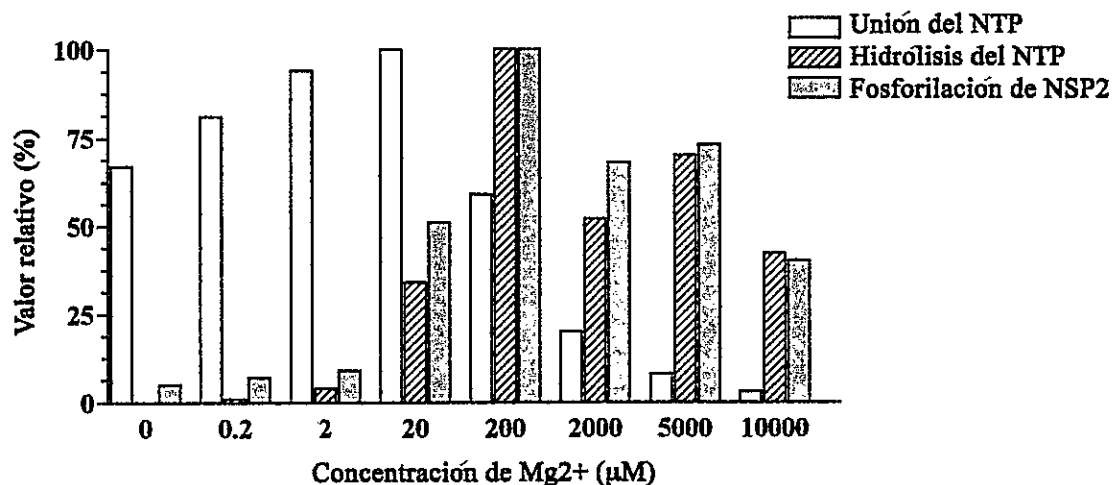


Figura 14. Requerimiento del Mg²⁺ en la unión e hidrólisis del ATP. Reacciones que contienen 27 pmol de NSP2 wt, 50mM Tris-HCl (pH 7.5), diversas concentraciones de Mg²⁺ y 4 pmol de 8-azido-[α-³²P]-ATP o [γ-³²P]-ATP, fueron incubadas por 5 min en hielo o por 1 hr a 37 °C, respectivamente. La unión del NTP fue monitoreada mediante el análisis de las proteínas con fotoentrecruzamiento luego de la exposición a luz UV (por SDS-PAGE). La hidrólisis del ATP se midió analizando una mitad de las reacciones que contiene [γ-³²P]-ATP para observar la formación de Pi (por TLC). La fosforilación de la proteína se monitoreó mediante el análisis de la otra mitad de las reacciones para observar NSP2-P (por SDS-PAGE). Los niveles de proteína fotomarcada (NSP2-ATP-[α-³²P]), ³²Pi y NSP2-³²P se detectaron y cuantificaron mediante PhosphorImager. Los valores obtenidos se normalizaron en cada conjunto respecto a su mayor valor, el que fue definido como 100%.

incubaron en condiciones similares a los ensayos de hidrólisis de NTP pero en presencia de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. Proteínas marcadas en la reacción fueron resueltas mediante SDS-PAGE, visualizadas por autoradiografía (Fig. 10C) y cuantificadas mediante un PhosphorImager (Fig. 10D). El análisis de los resultados, y como demuestran los estudios realizados previamente (Taraporewala et al., 1999), indican que la proteína NSP2 *wt* presenta autofosforilación como consecuencia de la hidrólisis del $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ presente en la reacción.

Los ensayos que contienen a las proteínas modificadas *E153A*, *Y171A*, *K188A*, *H225A*, y *R227A* muestran mínima o ninguna autofosforilación, lo cual se correlaciona bastante bien con la observación que estas proteínas no presentan niveles de actividad NTPasa mayores al 10% respecto a la *wt* (Fig. 10B). De manera similar los niveles de autofosforilación presentados por las proteínas modificadas *H110A* y *K223A*, 60 y 30% respecto al *wt*, respectivamente; son proporcionales a los niveles de actividad NTPasa que presentan (65 y 25% con respecto al *wt*, respectivamente). En conclusión el análisis de los resultados obtenidos en estas siete proteínas, demuestra que existe una estrecha relación entre el grado de autofosforilación de la proteína y de su actividad NTPasa. Como hecho anecdótico y en contraste a lo observado anteriormente, la proteína modificada *H221A* presenta niveles intermedios de autofosforilación ($\geq 50\%$ respecto al *wt*) aunque se encuentre severamente afectada en su capacidad de hidrolizar a los NTPs ($\leq 10\%$ respecto al *wt*) (Fig. 10B).

8. Cinética de hidrólisis del ATP y de autofosforilación de NSP2.-

La cinética de hidrólisis del ATP por la proteína silvestre, la proteína modificada *H221A* y las otras dos modificaciones que presentan algún grado de actividad NTPasa, es decir *H110A* y *K223A*, se analizó mediante un grafico de Michaelis-Menten de concentración de sustrato versus velocidad de hidrólisis (Fig. 15A). La estimación de los parámetros cinéticos a partir del grafico muestran que los valores de K_m para las proteínas *wt*, *H221A*, *H110A* y *K223A* son muy similares, variando en menos de dos veces (Tabla II). En contraste el valor de la V_{max} para la proteína modificada *H221A* es de dieciocho veces menor a la observada para la proteína *wt*, mientras que el valor para las proteínas modificadas *H110A* y *K223A* es de dos y cuatro veces menor a la *wt*, respectivamente. Estos datos indican que la modificación *H221A* causa una reducción en la velocidad de hidrólisis del ATP sin afectar significativamente la unión del sustrato (afinidad).

Con el fin de obtener mas información acerca del mecanismo por el cual la proteína modificada *H221A* obtiene niveles intermedios de fosforilación aun con niveles muy bajos de hidrólisis de ATP (Fig. 10, B y D), la hidrólisis del ATP y autofosforilación de esta mutante se compararon con los de la proteína silvestre y las modificadas *H110A* y *K223A* en función del tiempo. Reacciones que contenían a las proteínas *wt* y *mt* en presencia de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ y MgCl_2 se incubaron por una hora a 37 °C. Se colectaron alícuotas de cada reacción a distintos tiempos de incubación y se analizaron tanto para observar la hidrólisis de ATP (TLC) como para observar la autofosforilación de la proteína (SDS-PAGE). Los resultados obtenidos muestran que la autofosforilación de la proteína *wt* llega al máximo a los 30 min de incubación, aunque el nivel de hidrólisis de

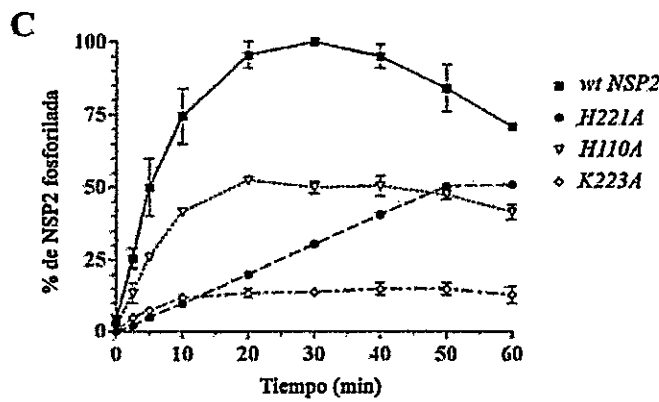
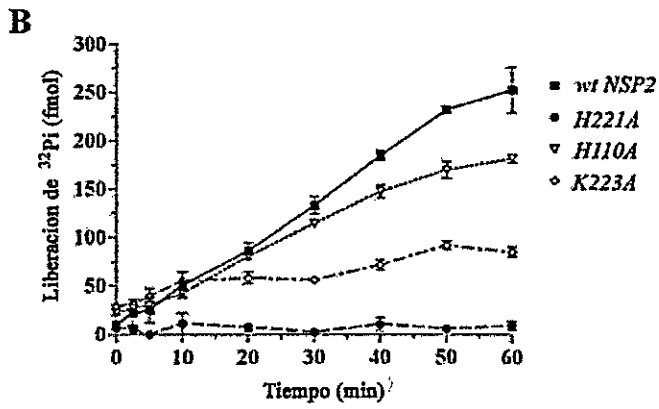
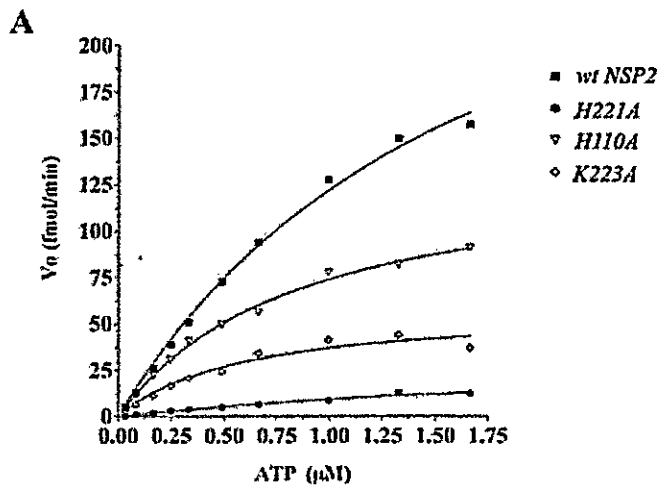


Figura 15. Relación entre la cinética de hidrólisis y autofosforilación. *A*, Cinética de hidrólisis del ATP. Reacciones de 10 μ l que contienen 9.8 pmol de proteína NSP2 *wt* o *mt* y concentraciones crecientes de [γ - 32 P]ATP fueron incubadas por 1 hr a 37 °C. La hidrólisis del ATP se midió mediante la detección y cuantificación del Pi liberado (TLC y PhosphorImager). La velocidad de liberación del 32 Pi (V_o) (fmol/min) se graficó en función a la concentración de sustrato (μ M). *B* y *C*, Hidrólisis del ATP y autofosforilación de NSP2 en función al tiempo. Reacciones de 20 μ l que contienen 28 pmol de proteína NSP2 *wt* o *mt* y 4 pmol de ATP [γ - 32 P]ATP (0.2 μ M) fueron incubadas a 37 °C por los distintos periodos de tiempo indicados. Una mitad de la reacción fue analizada para observar la hidrólisis de ATP mediante TLC (*B*), mientras que la otra mitad se analizó para observar la proteína fosforilada por SDS-PAGE (*C*). El nivel de 32 Pi liberado y de proteína marcada con 32 P fue determinado mediante un PhosphorImager. Los niveles obtenidos de proteína marcada se normalizaron respecto al nivel máximo observado para la proteína *wt*, definido como 100%.

TABLA II

Parámetros cinéticos de la actividad NTPasa de las proteínas NSP2 *wt* y *mt*:

Proteína	V _{max} (fmol/min)* ¹	K _m (μM)*
<i>wtNSP2</i>	18	0.650
<i>H110A</i>	9	0.425
<i>H221A</i>	1	0.635
<i>K223A</i>	4	0.375

*Los valores de V_{max} y K_m fueron determinados mediante regresión no lineal de las curvas hiperbólicas en la ecuación de Michaelis-Menten usando el programa Prism 4.0 (GraphPad Software). ¹V_{max} es reportado como el número de producto formado (Pi) en fmol por min por pmol de enzima.

ATP aumente durante todo el periodo de incubación (60 min) (Fig. 15, B y C). Muy distinto es el caso de la proteína modificada *H221A*, en la cual el nivel de autofosforilación de la proteína se incrementa gradualmente en el periodo de incubación, llegando a un máximo a un tiempo mucho más tardío que el de las proteínas *wt*, *H110A* y *K223A*. Notablemente el nivel máximo alcanzado por la proteína *H221A* en el tiempo dado de reacción (a los 50–60 min de incubación), es aproximadamente el 50% respecto al *wt* aun cuando la hidrólisis del ATP durante el periodo de incubación entero nunca sobrepasa más del 10% de hidrólisis respecto al *wt*. El análisis también reveló que aunque las proteínas modificadas *H110A* y *K223A* presentan mayores niveles de hidrólisis de ATP, estas presentan un nivel menor o igual de autofosforilación al de la proteína *H221A*. Los resultados obtenidos indican que el grado de hidrólisis del ATP no es el único determinante de la autofosforilación en NSP2.

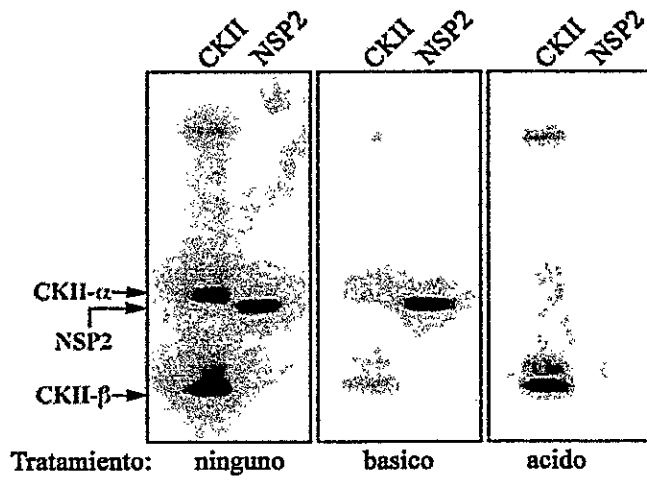
9. Estabilidad del intermediario fosforilado en NSP2.-

Otro factor que puede influir el nivel de fosforilación es la estabilidad del aminoácido fosforilado, específicamente la susceptibilidad de hidrólisis del enlace fosfo-aminoácido. La estabilidad del enlace fosfo-aminoácido depende de su naturaleza, los enlaces fosforamidatos (P-N) y fosfoesteres (P-O) difieren en su susceptibilidad a hidrólisis dependiendo de las condiciones, ya sean ácidas o alcalinas (Hildebrandt & Fried, 1989). La naturaleza del enlace fosfo-aminoácido en NSP2, formado durante la hidrólisis del NTP fue analizada en función al pH. En este ensayo se incubó a la proteína NSP2 silvestre en presencia de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ por 1hr a 37 °C, como control se incubó en paralelo a la proteína CKII, la cual se autofosforila en serinas presentes en la subunidad β (Hinrichs et al., 1993, Litchfield et al., 1991), por 30 min a 30 °C. Las proteínas se

separaron por medio de SDS-PAGE y posteriormente se transfirieron a membranas de difluoruro polivinilideno (PVDF), las cuales fueron tratadas por 2 hr a 65 °C ya sea en medio ácido (6 M HCl) o básico (1M KOH). Las proteínas que contienen marca radiactivamente fueron detectadas mediante autoradiografía después del tratamiento ácido/básico. Como se muestra en la figura 16A, el enlace fosfo-aminoácido formado en NSP2 y a diferencia del formado por la subunidad β de CKII, es estable en condiciones alcalinas y no así en condiciones ácidas. Debido a que los enlaces P-O son característicos debido a su sensibilidad en condiciones básicas, mientras los enlaces P-N son estables a pH básico (Hildebrandt & Fried, 1989, Klumpp & Krieglstein, 2002), los resultados sugieren que la hidrólisis del NTP en NSP2 procede con la formación de un enlace covalente de naturaleza fosforamidato (P-N). Dada su similitud estructural con las proteínas HIT, es factible pensar que la autofosforilación en NSP2 durante la hidrólisis del NTP podría también estar representando a la formación de un intermediario de reacción fosfohistidina (Brenner, 2002, Lima et al., 1997).

La cinética de liberación del fosfato de la fosfohistidina, resultado de un segundo ataque nucleofílico, es significativamente influenciado por los aminoácidos circundantes (Klumpp & Krieglstein, 2002). Por lo tanto es posible que las mutaciones introducidas cerca o en el sitio activo afecten al segundo paso de la hidrólisis (liberación del fosfato) y por lo tanto la estabilidad del intermediario fosforilado. Con el fin de determinar si la estabilidad del fosfoaminoácido en la proteína modificada *H221A* difiere al de la proteína silvestre, reacciones que contienen a la proteína *wt* o *H221A*, [γ - ^{32}P]ATP y MgCl_2 fueron incubadas por un periodo de 2 hrs a 37 °C. Luego de la primera hora de incubación, algunas reacciones fueron bloqueadas para la subsiguiente hidrólisis del ATP mediante la

A



B

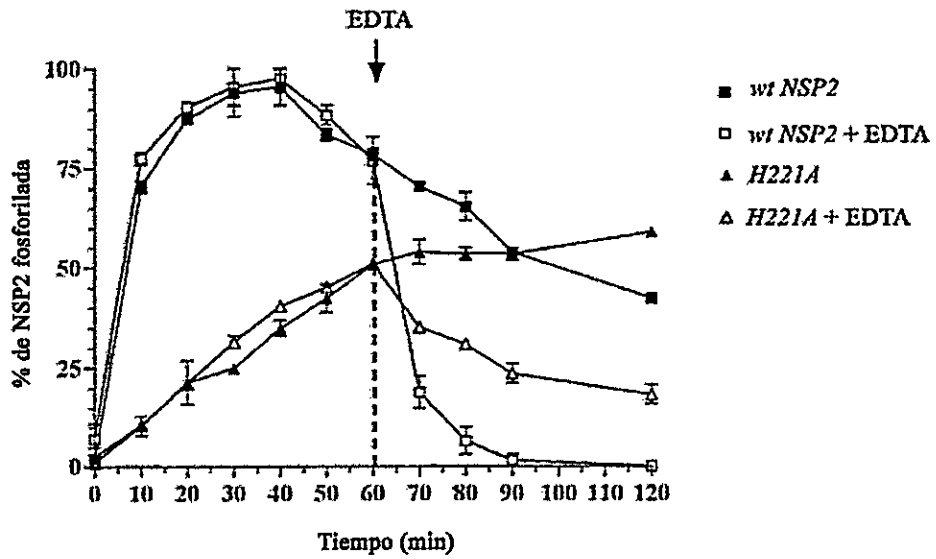


Figura 16. Estabilidad del fosfoaminoácido de la proteína NSP2 silvestre y modificada H221A. *A*, La estabilidad del enlace fosfoaminoácido fue determinada en condiciones ácidas y alcalinas. Reacciones que contenían 28 pmol de NSP2 o 500 unidades de CKII y 10 μ Ci de [γ - 32 P]ATP en un volumen final de 20 μ l, fueron incubadas por 1 hr a 37 $^{\circ}$ C y por 30 min a 30 $^{\circ}$ C, respectivamente. Las proteínas fosforiladas fueron resueltas por SDS-PAGE al 12% y transferidas a una membrana de PVDF. Las membranas (que contienen reacciones paralelas) fueron secadas y autoradiografiadas directamente o post-incubación en condiciones ácidas o alcalinas por 2 hr a 65 $^{\circ}$ C. En el caso de la proteína quinasa CKII, ambas de sus subunidades presentan fosforilación y ya que solo es conocida en detalle la fosforilación que ocurre en la subunidad β (Ser-P), solo esta es útil como control de enlaces fosfoéster (P-O). *B*, Reacciones que contienen 28 pmol de NSP2 *wt* o *H221A* y 10 μ Ci de [γ - 32 P]ATP fueron incubadas a 37 $^{\circ}$ C por 2 hr. Después de la primera hora de incubación se agregó a ciertas reacciones el agente EDTA (50 mM final). Diversas alícuotas fueron recuperadas durante distintos tiempos de la reacción y fueron posteriormente analizadas por SDS-PAGE. Los niveles de proteína fosforilada se detectaron y cuantificaron mediante PhosphorImager. El nivel máximo de fosforilación de la proteína NSP2 *wt* fue definido como 100%.

adición de EDTA, produciendo por lo tanto el secuestro del ion necesario para la actividad NTPasa de NSP2. Se recuperaron alícuotas durante las dos horas de incubación para analizar los niveles de proteína fosforilada. Los resultados obtenidos muestran que tras la inhibición de la hidrólisis del ATP producida por la adición de EDTA, se observa un decaimiento de la marca o pérdida del fosfato de la proteína en el tiempo, tanto en la proteína *wt* como *H221A* (Fig. 16B). Sin embargo la pérdida del fosfato en la proteína *wt* es mas rápida y sucede en mayor grado que respecto a la modificada, dando como resultado que los niveles de fosforilación lleguen a un menor nivel para la proteína *wt* en el tiempo dado de reacción. Estos datos sugieren que a consecuencia de la modificación H221A en NSP2, el fosfoaminoácido en la proteína mutante *H221A* posee mayor estabilidad que el formado en la proteína *wt*. Esta característica provee una explicación plausible al fenómeno ocurrido en la proteína *H221A*, donde la mutante llega a niveles relativamente altos de fosforilación a pesar de poseer una actividad NTPasa muy disminuida.

10. Hidrólisis del ATP e interacción RNA-proteína en NSP2.-

NSP2 es capaz de unir RNA de simple hebra con una alta afinidad y de una manera inespecífica (independiente de la secuencia) (Taraporewala et al., 1999). La interacción con el RNA por parte de la proteína NSP2 es independiente de la presencia tanto de nucleótidos como de Mg^{2+} y ocurriría en depresiones electropositivas ubicadas en la periferia del octámero. Con el objeto de determinar si la modificación en alguno de los residuos provoca un cambio detectable en la interacción de la proteína con la molécula de RNA, se realizaron ensayos de retardo en la movilidad electroforética

(EMSA). La proteína silvestre y las modificadas se incubaron en presencia de RNA marcado con ^{32}P y se incubaron por 30 min a temperatura ambiente. Los complejos RNA-proteína fueron identificados mediante electroforesis no denaturante y posterior autoradiografía (Fig. 17). El análisis de los resultados obtenidos indica que las proteínas modificadas severamente afectadas en su actividad NTPasa son capaces de interactuar con el RNA de una forma similar a la proteína *wt*. Por lo tanto las distintas modificaciones no interfieren en la capacidad de la proteína de interactuar con la molécula de RNA. Estos resultados concuerdan con el análisis de los resultados obtenidos en la centrifugación zonal, debido a que la forma octamérica de la proteína se ha descrito como la forma funcional, la que es capaz de interactuar con el RNA.

11. Hidrólisis del ATP por NSP2 y fosforilación *in vitro* de NSP5.-

La presencia de NSP2 provoca un marcado incremento de la fosforilación de NSP5 tanto *in vitro* como *in vivo* (Afrikanova et al., 1998, Vende et al., 2002). El mecanismo de acción de NSP2 en la inducción de la fosforilación de NSP5 es desconocido. Diversas hipótesis han sido postuladas en como NSP2 puede mediar la fosforilación de NSP5. Se postuló que NSP2 podría mediar la fosforilación de NSP5 mediante la transferencia de los fosfatos generados a través de su actividad NTPasa. Se postuló también que NSP2 al interactuar con NSP5, produciría en esta última la activación de su actividad autoquinasa. Con el fin de determinar la relación entre la actividad NTPasa de NSP2 y la fosforilación de NSP5, proteínas silvestre y modificadas de NSP2 se incubaron en presencia de NSP5, $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ y MgCl_2 . Las proteínas posteriormente se analizaron mediante SDS-PAGE y autoradiografía (Fig. 18, A y B).

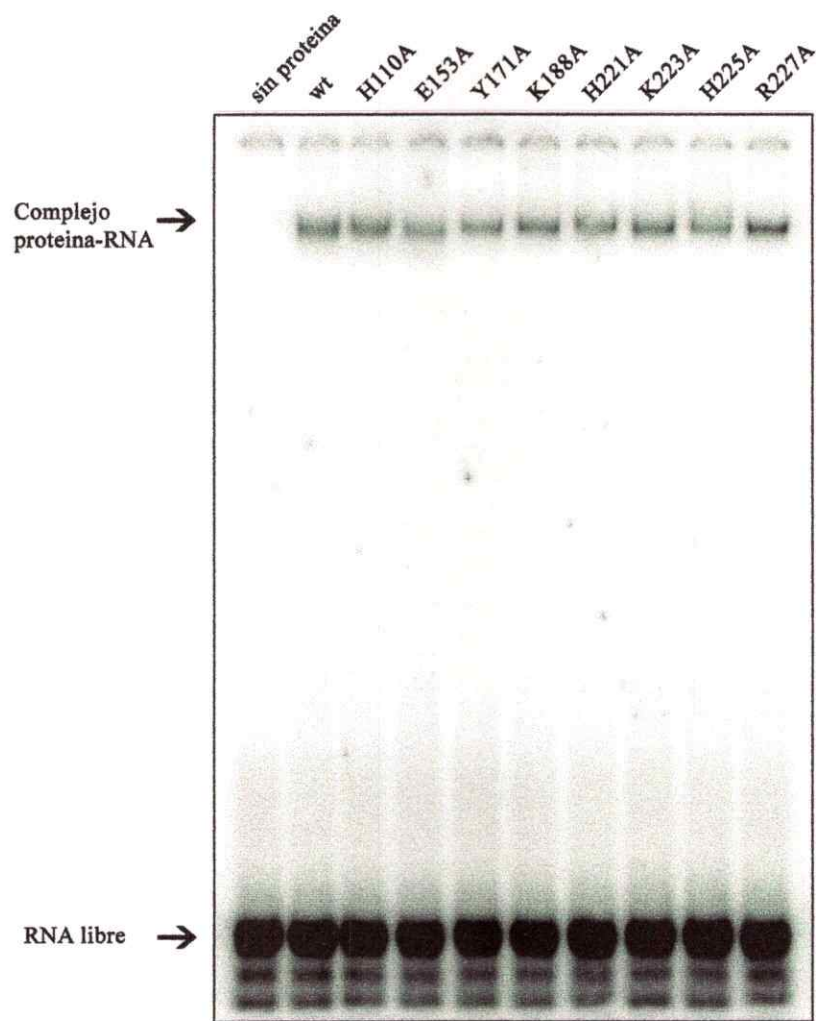


Figura 17. Interacción proteína-RNA en las distintas proteínas modificadas de NSP2. Reacciones que contienen a las proteínas NSP2 *wt* o *mt* (4 pmol) y RNA de 72 nucleótidos marcado con ^{32}P (sonda) fueron incubadas por 30 min a temperatura ambiente. Los complejos NSP2-RNA formados fueron separados mediante electroforesis no denaturante en geles de poliacrilamida al 6% e identificados mediante autoradiografía.

Como se reportó previamente, la purificación de NSP5 presenta pequeñas cantidades de una proteína contaminante, la proteína de bacteria DnaK. Se observa esta proteína marcada en los ensayos de fosforilación debido a la alta afinidad que posee por el ATP (Fig. 18A) (Vende et al., 2002).

Los resultados obtenidos muestran que NSP5 en ausencia de NSP2 presenta un bajo nivel de fosforilación asociado a su actividad autoquinasa (Fig. 18A) (Afrikanova et al., 1996, Blackhall et al., 1997, Poncet et al., 1997). Se observa que en la presencia de la proteína NSP2 *wt*, la fosforilación de NSP5 se ve aumentada de 5 a 10 veces, acorde a lo descrito anteriormente (Vende et al., 2002). En contraste, se observa que la presencia de cualquiera de las cinco proteínas modificadas que poseen una actividad NTPasa deficiente o nula (*Y171A*, *K188A*, *H221A*, *H225A*, y *R227A*) (Fig. 10B), no produce un mayor cambio en la fosforilación de NSP5 respecto a su fosforilación basal. Estos resultados indican que la inducción de la fosforilación de NSP5 *in vitro* requiere de la hidrólisis del ATP por parte de NSP2. Esto es consistente con la fosforilación de NSP5 observada en la presencia de las proteínas modificadas de NSP2 que poseen cierto nivel de actividad NTPasa (*H110A* y *K223A*). Sin embargo, es importante tener en consideración que el grado de fosforilación en NSP5 no está directamente relacionado con el nivel de hidrólisis del NTP por NSP2, por ejemplo en el caso de la proteína modificada *K223A* que presenta menor actividad NTPasa que la proteína *H110A* (Fig. 10B), la fosforilación de NSP5 se ve incrementada a un nivel mucho más alto que el observado en la presencia de *H110A*.

Notablemente también se observó que no existe una conexión directa entre la fosforilación de las proteínas NSP2 y NSP5. Por ejemplo en el caso de la proteína

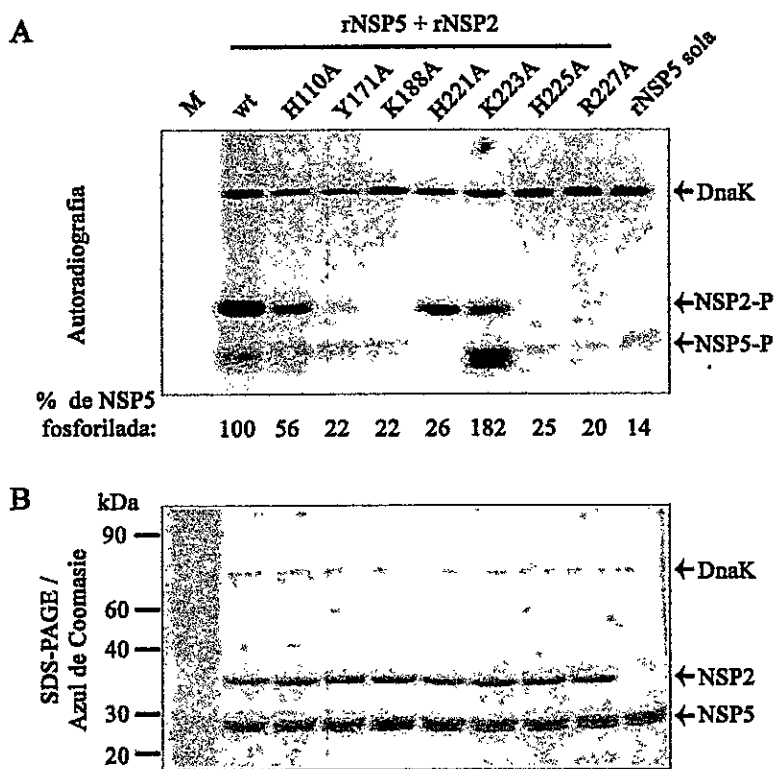


Figura 18. Efecto de la actividad NTPasa de NSP2 en la fosforilación *in vitro* de NSP5. Reacciones que contenían NSP5 sola (70 pmol) o en presencia de NSP2 *wt/mt* (28 pmol) y $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ se incubaron por 2 hr a 37 °C. Las proteínas de las reacciones fueron identificadas por SDS-PAGE al 12% y posterior tinción de azul de Coomasie (**B**). La proteínas fosforiladas con ^{32}P se detectaron por autoradiografía (**A**) y cuantificaron por PhosphorImager. *M*, marcador de peso molecular; NSP2-P, NSP2 fosforilada; NSP5-P, NSP5 fosforilada.

modificada *H221A*, la cual presenta un nivel de fosforilación mayor al de la proteína *K223A*, y sin embargo no es capaz de estimular la fosforilación de NSP5 a diferencia de *K223A* (Fig. 18A). Los datos obtenidos permiten sugerir que la fosforilación *in vitro* de NSP5 en presencia de NSP2 no se debe a una transferencia directa del fosfato hidrolizado por parte de NSP2 a NSP5.

12. Hidrólisis del ATP por NSP2 y fosforilación *in vivo* de NSP5.-

En células infectadas por rotavirus como en células que co-expresan NSP2 y NSP5, es posible observar diversas isoformas fosforiladas de NSP5 que van de pesos moleculares aparentes de 28 y 32–34 kDa (Afrikanova et al., 1998, Afrikanova et al., 1996, Poncet et al., 1997). Con el fin de determinar si la fosforilación observada *in vivo* en NSP5 depende de la actividad NTPasa de NSP2, como es el caso *in vitro*, la proteína NSP2 silvestre y tres de sus modificaciones deficientes en su actividad NTPasa (E153A, K188A, y H225A), fueron expresadas transientemente junto a NSP5 en células MA104. Las proteínas sintetizadas en la célula fueron marcadas radiactivamente ya sea por la adición de [³⁵S]metionina o [³²P]ortofosfato al medio de cultivo celular, y posteriormente se analizaron por SDS-PAGE y autoradiografía (Fig. 19). Los resultados obtenidos muestran a la forma fosforilada de 28 kDa (flecha negra) como la única forma fosforilada de NSP5 si esta es expresada en ausencia de NSP2 (carril 4). En contraste, las múltiples isoformas fosforiladas de NSP5 (flecha blanca) se observan cuando NSP2 se encuentra presente, ya sea tanto la proteína silvestre como las modificadas (carriles 5–8). Inclusive la relación de la forma hiperfosforilada de NSP5 respecto a la forma fosforilada (28 kDa) es similar en las células que expresan ya sea a la proteína *wt* NSP2 o a las modificadas

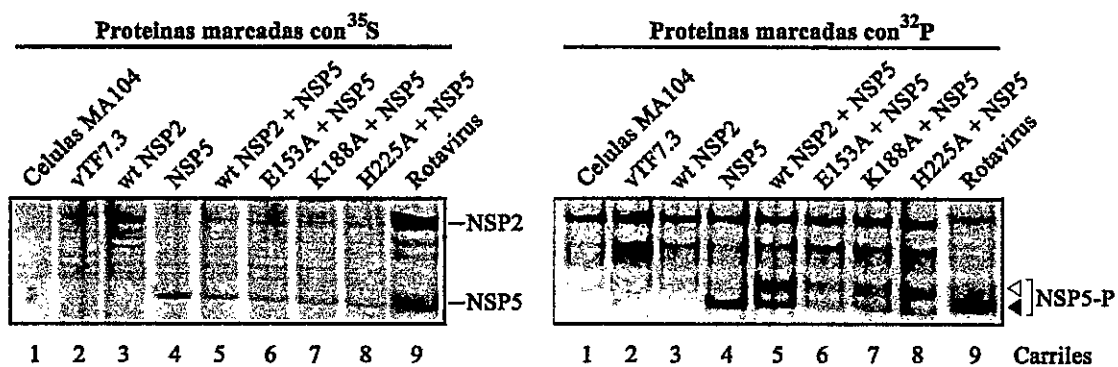


Figura 19. Efecto de la actividad NTPasa de NSP2 en la hiperfosforilación *in vivo* de NSP5. Células MA104 fueron infectadas con virus vacuna (vaccinia) recombinante vTF7.3 y tranfectadas con los plasmidios apropiados para co-expresar la proteína NSP5 y formas *mt* o *wt* de la proteína NSP2. Como control de expresión de proteínas virales, algunas células se infectaron con rotavirus SA11 (Rotavirus). Las células fueron mantenidas en presencia de marca radioactiva, [³⁵S]metionina o [³²P]ortofosfato, posteriormente lisadas y analizadas para observar la presencia de marca en las proteínas mediante SDS-PAGE y autoradiografía. La forma fosforilada (28 kDa) de NSP5 se indica mediante una fecha blanca, mientras que las formas hiperfosforiladas se indican con una flecha negra. NSP5-P, NSP5 fosforilada.

(E153A, K188A y H225A). Por lo tanto las proteínas modificadas deficientes en la actividad NTPasa son capaces de inducir la hiperfosforilación *in vivo* de la proteína NSP5 de una manera comparable a la proteína *wt* NSP2. Estos resultados contrastan con los obtenidos en los ensayos *in vitro*, en los cuales las proteínas modificadas deficientes en la actividad NTPasa son incapaces de inducir la fosforilación de NSP5. Es factible que el mecanismo por el cual NSP2 promueve la fosforilación de la proteína NSP5 *in vivo* sea distinto al que opera *in vitro*. Esta observación es favorecida por el hecho que *in vitro* no se producen las isoformas hiperfosforiladas de NSP5 de 32-34 kDa, las cuales presentan una migración menor a la forma de 28 kDa.

13. Hidrólisis del ATP por NSP2 y formación de estructuras tipo-viroplasma.-

La co-expresión de NSP2 y NSP5 en células MA104 no solo produce la hiperfosforilación de NSP5, sino que también la formación de inclusiones proteicas formadas por ambas proteínas. Estas inclusiones proteicas recuerdan a los viroplasmos formados en células infectadas por rotavirus (Fig. 20), y aunque carecen de otras proteínas virales o RNA viral fueron descritas como estructuras tipo-viroplasma (Fabbretti et al., 1999). NSP2 y NSP5, si son expresadas individualmente presentan una distribución dispersa en la célula y no forman las inclusiones observadas cuando se encuentran simultáneamente en la célula (Fig. 20). Con el fin de determinar si la actividad NTPasa en NSP2 es un factor determinante en la formación de estructuras tipo-viroplasma, la proteína NSP2 silvestre y dos de las proteínas modificadas que están severamente afectadas en su actividad NTPasa (E153A y K188A), fueron co-expresadas con la proteína NSP5 en células MA104. El análisis de las células mediante

inmunofluorescencia y microscopia confocal, muestra que las proteínas modificadas como es el caso de la *wt* co-localizan con NSP5 formando las estructuras tipo-viroplasma. Los resultados obtenidos indican que la actividad NTPasa de NSP2 no es requerida para que la proteína participe en la formación de las estructuras. Los resultados también permiten postular que la actividad NTPasa podría estar relacionada con eventos que ocurren post-formación de los viroplasma.

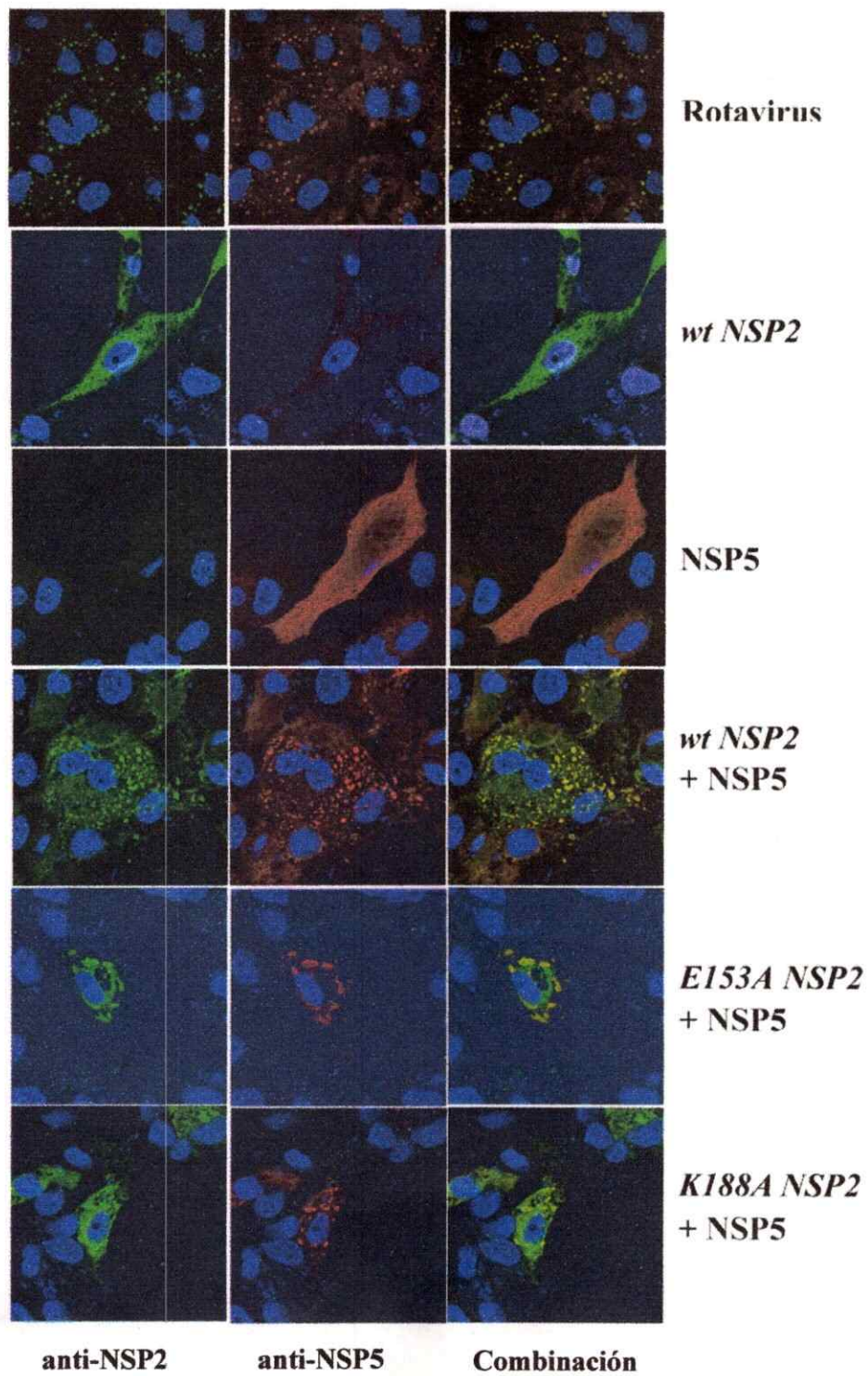


Figura 20. Importancia de la actividad NTPasa de NSP2 en la formación de estructuras tipo-viroplasma. Células MA104 fueron infectadas con rotavirus SA11 o con virus vacuna vTF7.3. Las células infectadas con vaccinia fueron transfectadas posteriormente con los plasmidios apropiados para expresar NSP5 y formas *mt* o *wt* de la proteína NSP2. La presencia y distribución de las proteínas en las células fue determinada mediante inmunofluorescencia y microscopia confocal. NSP2 y NSP5 se detectaron utilizando los anticuerpos (Ab) policlonal de cobayo anti-NSP2 y monoclonal de raton anti-NSP5, y posteriormente los anticuerpos secundarios anti-cobayo unido al fluoroforo Alexa488 (verde/NSP2) y anti-raton Alexa594 (rojo/NSP5), respectivamente. La co-localización de las proteínas se representa en amarillo en la combinación de las imágenes.

DISCUSION

Los rotavirus son la principal causa de diarrea en los seres humanos y otros mamíferos. Actualmente no existen terapias antivirales efectivas contra estos virus. En los últimos años se han desarrollado diversas vacunas contra rotavirus basadas en virus reordenantes, y aunque las vacunas demostraron producir una inmunidad efectiva en contra del virus, estas han sido asociadas con el riesgo de causar efectos secundarios no deseados como es el caso de la intusepción (invaginación de los intestinos del neonatal) (Chang et al., 2001, Kapikian, 2001). Por lo tanto es de gran interés desarrollar nuevos sistemas efectivos de control viral, alternativos a las vacunas, como son las drogas antivirales. Para poder desarrollar estas nuevas terapias antivirales, es importante entender el mecanismo de replicación del virus, en particular el funcionamiento de las proteínas no estructurales en el ciclo viral, ya sea a nivel de su mecanismo de acción como de su relación con otros componentes virales.

El presente estudio identifica y caracteriza a la hendidura profunda de 25 Å formada por los dominios C- y N-terminal del monómero de la proteína NSP2, como el sitio de unión e hidrólisis del NTP. La ubicación de este sitio fue sugerida anteriormente como una consecuencia de la similitud estructural parcial que existe entre NSP2 y un miembro prototipo de las proteínas HIT de la familia de las nucleotidil hidrolasas (Jayaram et al., 2002). Los resultados obtenidos en combinación con la similitud estructural observada previamente, indican que las histidinas (H221, H225) en NSP2 juegan un rol crítico en hidrólisis del NTP, la cual es una característica similar a las de las proteínas HIT.

La estructura cristalizada de NSP2 muestra que la región carboxi terminal, constituida por los 80 aminoácidos finales adquiere una estructura tridimensional particular formada por hojas β rodeadas de α hélices, constituyendo el dominio C-terminal de la proteína. Este dominio presenta una asombrosa similitud estructural con la parte carboxi terminal (catalítica) de la proteína PKCI, representante de una de las subfamilias de las proteínas HIT (Brenner et al., 1999, Jayaram et al., 2002). En esta región de NSP2 se encuentra la His225, aminoácido que fue propuesto como el aminoácido catalítico en la hidrólisis del NTP debido a su posición equivalente con la His112 en PKCI (menos de 1 Å de distancia tras la superposición de las estructuras). La His112 en PKCI es la segunda histidina de la tríada y principal aminoácido catalítico (Jayaram et al., 2002, Lima et al., 1997). La modificación de la His225 por alanina en NSP2 produce una disminución dramática sino es completa de la actividad NTPasa, consistente con la proposición de su posible función como el aminoácido catalítico en NSP2. En adición, la modificación de los residuos conservados en la hendidura, cercanos a la His225, es decir los aminoácidos Lys188, His221, y Arg227, también afecta de manera drástica la actividad NTPasa. Aunque PKCI y NSP2 carecen de similitud a nivel de secuencia y esta última carece del clásico motivo HIT (HØHØHØØ), los resultados en conjunto con los antecedentes plantean la posibilidad que ambas proteínas posean un sitio similar de unión y/o hidrólisis del NTP.

Evidencia adicional que la His225 y los aminoácidos circundantes en la hendidura de NSP2 forman un sitio de unión al ATP, fue provista por los resultados obtenidos por las simulaciones computacionales de unión de ATP. Estas simulaciones mostraron que las diez mejores interacciones (menor energía) del ATP con la proteína ocurrían entre los

residuos ubicados en la vecindad de la His225, sorprendentemente los residuos Lys188 y Arg227. El análisis computacional indica que las características de la hendidura, en especial su naturaleza altamente electropositiva, pueden tener un impacto en la unión óptima del nucleótido a la proteína. Las predicciones de unión o acoplamiento del ligando muestran que la unión del NTP en la hendidura está dada por los fosfatos y no por el motivo nucleósido del sustrato, proveyendo una explicación a la falta de especificidad en la actividad NTPasa de NSP2 observada en los ensayos experimentales. Inclusive, la falta de reconocimiento por el nucleósido abre la posibilidad que otras moléculas que contienen polifosfatos, por ejemplo el extremo 5'- γ fosfato del RNA, puedan servir como sustratos de hidrólisis para la actividad de NSP2.

A pesar que ambas proteínas, NSP2 y PKCI, presenten similitud parcial en sus estructuras y en la forma de sus sitios activos, la proteína NSP2 de rotavirus difiere de PKCI y otras proteínas HIT en varios aspectos, como son: en la especificidad por el sustrato, en el requerimiento del Mg^{2+} para la hidrólisis y en su estado oligomérico (Brenner, 2002, Jayaram et al., 2002, Lima et al., 1997). La hidrólisis del NTP en las proteínas HIT, que son dímeros en su mayoría, difiere de la hidrólisis que se observa en NSP2. Mientras que las proteínas HIT hidrolizan en su mayoría dinucleótidos polifosfatos (ApppA) para dar como producto nucleótidos monofosfatos (AMP) vía un mecanismo independiente de cationes (Brenner, 2002, Brenner et al., 1999, Lima et al., 1997), los octámeros de NSP2 hidrolizan los NTPs liberando el fosfato gamma vía un mecanismo dependiente de Mg^{2+} . Estas diferencias presentan la posibilidad que NSP2 y las proteínas HIT difieran fundamentalmente en el mecanismo por el cual hidrolizan los nucleótidos trifosforados, aun cuando ambas muestren un alto grado de similitud

estructural en el plegamiento de sus sitios activos. Probablemente esta similitud estructural de los sitios activos se debió a una evolución convergente para realizar una función enzimática similar, como es el caso observado en las RNA polimerasas virales y celulares, las cuales tienen un origen distinto pero comparten un plegamiento general similar. En el estudio presentado, es evidente que la modificación del glutamato 153 y la tirosina 171, los dos residuos propuestos como coordinadores del ion Mg^{2+} , resultan en una actividad NTPasa severamente afectada. Esta pérdida de la actividad NTPasa es consistente con el requerimiento del ion Mg^{2+} en la hidrólisis de los NTPs. Los resultados obtenidos utilizando el análogo fotoreactivo del ATP para estudiar la unión del sustrato, indican que NSP2 une eficientemente el ATP aun en la ausencia del ion Mg^{2+} . Este evento es similar al ocurrido en las proteínas HIT, donde estas proteínas no requieren la presencia del cation para la unión del sustrato. Por lo tanto, es aparente que la diferencia en el requerimiento del ion en NSP2 y las proteínas HIT es a nivel del evento de hidrólisis. Debido a que el Mg^{2+} tiene un efecto en la conformación del NTP (Lima et al., 1997, McIntosh et al., 2003), la presencia del cation puede ser importante para el correcto posicionamiento del NTP en el sitio activo de una manera tal en que se pueda producir la hidrólisis. Los resultados experimentales y computacionales obtenidos nos permiten hacer ciertas predicciones mecanísticas acerca del posible rol de los aminoácidos modificados en la actividad NTPasa de NSP2: los residuos Lys188, His221, His225 y Arg227 podrían estar participando directamente en la unión y hidrólisis del NTP, posiblemente la His225 actuando como principal residuo catalítico; los residuos Asp153 y Tyr171 podrían estar participando en la coordinación del ion Mg^{2+} , siendo por lo tanto críticos en la actividad; y los residuos His110 y Lys223 probablemente solo

contribuyen al ambiente positivo de la hendidura y tienen un efecto en la unión y/o hidrólisis óptima del NTP, representando por lo tanto aminoácidos no críticos para la actividad.

La hidrólisis del NTP es acompañada por la autofosforilación de la proteína (Taraporewala et al., 1999). La fosforilación de la proteína aunque requiere de la hidrólisis del NTP, presenta una acumulación neta desproporcionalmente baja comparada a la acumulación de los productos generados (NDP + Pi) (Fig. 15, B y C). Esto puede deberse a que las especies fosforiladas generadas no son estables en el tiempo, ya que los resultados presentados indican que la proteína fosforilada sufre una rápida desfosforilación una vez que la actividad NTPasa de la proteína fue inhibida (Fig. 16B). Estas características en conjunto, sugieren que la hidrólisis del ATP es seguida por la formación de un intermediario entre el liberado fosfato gamma y un aminoácido básico (posiblemente H225). Este posible intermediario fosforilado se encuentra unido vía un enlace covalente de naturaleza fosforamidato (Fig. 16A). La formación de un intermediario fosforilado o nucleotilado de estas características es común en ciertas enzimas luego de ocurrida la hidrólisis del NTP u otro sustrato similar, por ejemplo: en las proteínas HIT, guanililil transferasas, nucleótido pirofosfatasas / fosfodiesterasas y fosfatasas alcalinas (Blytt et al., 1985, Gijbers et al., 2001, Lima et al., 1997, Shuman, 2001). Los resultados obtenidos en NSP2 permiten observar también que la velocidad de desfosforilación de la proteína es menor que su velocidad de fosforilación, lo cual influye en la detección de la forma fosforilada de NSP2 en los ensayos de actividad NTPasa usando $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. En el caso de las de las proteínas HIT, la liberación del fosfato unido de la proteína (desfosforilación) es el resultado de un segundo ataque nucleofílico. En

estas proteínas, la tercera histidina produce la activación de la molécula de agua que posteriormente realizara el segundo ataque nucleofílico y por lo tanto la hidrólisis del intermediario (Fig. 7) (Brenner, 2002, Lima et al., 1997). En caso de NSP2 se encontró una molécula de agua en la proximidad del sitio de unión de los NTPs, y aunque NSP2 no posee una estricta tríada de histidinas esta podría funcionar en el segundo ataque nucleofílico. Los resultados también indican que la His221 en NSP2 puede estar participando en el segundo ataque nucleofílico debido a que la modificación en este residuo produce una forma fosforilada mas estable. La inhabilidad de la proteína modificada *H221A* de sufrir una eficiente desfosforilación puede tener un efecto en la capacidad de la proteína de volver a su estado basal (reciclarse) y por lo tanto poder realizar otra ronda de hidrólisis. En conclusión, el bajo nivel de desfosforilación observado en la proteína *H221A* puede tener un impacto en su bajo nivel asociado de actividad NTPasa.

NSP2 estimula la fosforilación de NSP5 *in vitro* y su hiperfosforilación *in vivo* (Figs. 18 y 19). Los resultados presentados en este estudio, muestran que la actividad NTPasa de NSP2 es necesaria para la fosforilación de NSP5 solo en un contexto fuera de la célula, es decir en ensayos *in vitro* con proteínas recombinantes. En el contexto celular, donde existen otras proteínas que pueden modificar el estado neto de fosforilación de NSP5 (quinasas y fosfatasas celulares), la hiperfosforilación de NSP5 solo requiere de la presencia de NSP2 y no de su actividad NTPasa (Fig. 19). Esta observación sugiere que durante la replicación viral, la hiperfosforilación no es consecuencia de una transferencia de fosfatos entre NSP2 y NSP5 como fue sugerido en otros estudios (Vende et al., 2002). En alternativa, parece mas probable que la hiperfosforilación derive de la actividad

autoquinasa de NSP5, cuya activación requiere de la interacción de NSP5 con NSP2 y talvez con otros factores como RNA o quinasas celulares. El propósito de la hiperfosforilación en NSP5 es desconocido, pero esta modificación ocurre inclusive en células que no están infectadas y por lo tanto no es dependiente de la replicación viral.

NSP2 y NSP5 juegan un rol critico en el ciclo viral en la célula infectada por rotavirus, produciendo la formación de inclusiones citoplasmáticas en las cuales sucede tanto el empaquetamiento y replicación del genoma viral como los primeros eventos de la morfogénesis del virion (Petrie et al., 1982, Petrie et al., 1984). El rol de la actividad NTPasa de NSP2 en el ciclo viral aun no es conocido, pero los análisis aportados en el siguiente estudio permiten sugerir que la actividad no tiene un rol en la formación de las inclusiones y por lo tanto ayuda a delimitar el rol de la actividad en ciclo de replicación de rotavirus. En los otros miembros de la familia *Reoviridae*, en especial en reovirus y en "blue tongue virus" (BTV), existen proteínas equivalentes a NSP2. Estas proteínas comparten similitudes funcionales con NSP2, aunque también presentan características propias. En el caso de la proteína σ NS de reovirus, la proteína presenta estado oligomérico, capacidad de unir RNA y de formar inclusiones, pero a diferencia de NSP2 carece de actividad NTPasa (Gillian & Nibert, 1998, Gillian et al., 2000, Mbisa et al., 2000). La actividad NTPasa es posiblemente aportada por otra proteína de reovirus, la proteína μ 2 (Kim et al., 2004). En el caso de BTV, la proteína NS2, el otro posible homologo de NSP2, presenta también estado oligomérico, capacidad de interactuar con el RNA, forma inclusiones y posee una potente actividad nucleotidil fosfatasa (Brookes et al., 1993, Horscroft & Roy, 2000, Taraporewala et al., 2001, Thomas et al., 1990, Uitenweerde et al., 1995). A pesar de las similitudes funcionales, estas proteínas no

presentan similitud a nivel de secuencia, lo cual puede deberse a la alta frecuencia de mutación en los virus de RNA. Notablemente, en el caso de NS2 de BTV, la proteína presenta una actividad nucleotidil hidrolasa pero carece de algún motivo similar al descrito en las proteínas HIT o en NSP2 (motivo tipo-*HIT*) que pueda estar implicado en la unión e hidrólisis del NTP. La eventual resolución de la estructura de NS2 es de gran interés debido a la posible presencia de un plegamiento de su estructura similar al que se observa en la proteína equivalente en rotavirus (NSP2). Por el momento la proteína de rotavirus NSP2, es la única proteína viral descrita que presenta un plegamiento *tipo-HIT* y que posee un sitio activo similar implicado en la unión e hidrólisis del NTP. Estas características pueden significar que NSP2 sea el representante de un nuevo y distinto grupo de nucleotidil hidrolasas virales, haciéndola un blanco atractivo para el desarrollo de drogas antivirales.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio, usando diversas técnicas y ensayos tanto experimentales (biología molecular y bioquímica) como computacionales (simulación molecular), permiten concluir que:

- i) La hendidura formada por los dominios C- y N-terminal en NSP2 es el sitio de unión e hidrólisis de las moléculas de NTPs.
- ii) Las histidinas 221 y 225 del motivo *tipo-HIT* y otros residuos conservados cercanos estructuralmente al motivo, representan aminoácidos críticos para la actividad nucleósido trifosfato fosfohidrolasa de NSP2.
- iii) La unión e hidrólisis de los NTPs por parte de NSP2 presenta características similares a las proteínas HIT, aunque también posee características únicas, especialmente en el mecanismo de hidrólisis de los NTPs.
- iv) El requerimiento del ion Mg^{2+} en NSP2 sería fundamental en el evento de hidrólisis del NTP y no así en su unión a la proteína.
- v) La hidrólisis del NTP por parte de NSP2 produciría la formación de un intermediario fosforilado inestable en la proteína.
- vi) La actividad NTPasa de NSP2 tiene un efecto inductor en la fosforilación basal de la proteína NSP5, pero no en la hiperfosforilación de NSP5 que se observa *in vivo*.
- vii) La actividad NTPasa de NSP2 no presenta relación con la formación de estructuras tipo viroplasma en células de mamífero co-transfectadas, lo cual

permite postular que la función de la actividad NTPasa de NSP2 en el ciclo viral sería requerida posterior a la formación del viroplasma.

BIBLIOGRAFIA

- Accelrys (1997). Insight II and Delphi user guide. San Diego CA.
- Afrikanova, I., Fabbretti, E., Miozzo, M. C. & Burrone, O. R. (1998). Rotavirus NSP5 phosphorylation is up-regulated by interaction with NSP2. In *J Gen Virol*, pp. 2679-86.
- Afrikanova, I., Miozzo, M. C., Giambiagi, S. & Burrone, O. (1996). Phosphorylation generates different forms of rotavirus NSP5. In *J Gen Virol*, pp. 2059-65.
- Bellamy, A. R. & Both, G. W. (1990). Molecular biology of rotaviruses. In *Adv Virus Res*, pp. 1-43.
- Berois, M., Sapin, C., Erk, I., Poncet, D. & Cohen, J. (2003). Rotavirus nonstructural protein NSP5 interacts with major core protein VP2. In *J Virol*, pp. 1757-63.
- Blackhall, J., Fuentes, A., Hansen, K. & Magnusson, G. (1997). Serine protein kinase activity associated with rotavirus phosphoprotein NSP5. In *J Virol*, pp. 138-44.
- Blackhall, J., Munoz, M., Fuentes, A. & Magnusson, G. (1998). Analysis of rotavirus nonstructural protein NSP5 phosphorylation. In *J Virol*, pp. 6398-405.
- Blytt, H. J., Brotherton, J. E. & Butler, L. (1985). Assay of covalent intermediate of 5'-nucleotide phosphodiesterase. In *Anal Biochem*, pp. 517-20.
- Brenner, C. (2002). Hint, Fhit, and GalT: function, structure, evolution, and mechanism of three branches of the histidine triad superfamily of nucleotide hydrolases and transferases. In *Biochemistry*, pp. 9003-14.
- Brenner, C., Bieganowski, P., Pace, H. C. & Huebner, K. (1999). The histidine triad superfamily of nucleotide-binding proteins. In *J Cell Physiol*, pp. 179-87.
- Brookes, S. M., Hyatt, A. D. & Eaton, B. T. (1993). Characterization of virus inclusion bodies in bluetongue virus-infected cells. In *J Gen Virol*, pp. 525-30.
- Brooks, B. R., Bruccoleri, R. E., Olafson, B. D., States, D. J., Swaminathan, S. & Karplus, M. (1983). CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization and dynamics calculations. In *J Comp Chem*, pp. 187-217.
- Chang, H. G., Smith, P. F., Ackelsberg, J., Morse, D. L. & Glass, R. I. (2001). Intussusception, rotavirus diarrhea, and rotavirus vaccine use among children in New York state. In *Pediatrics*, pp. 54-60.
- Chizhikov, V. & Patton, J. T. (2000). A four-nucleotide translation enhancer in the 3'-terminal consensus sequence of the nonpolyadenylated mRNAs of rotavirus. In *Rna*, pp. 814-25.
- Chnaiderman Xiao, J., Barro, M. & Spencer, E. (2002). NSP5 phosphorylation regulates the fate of viral mRNA in rotavirus infected cells. In *Arch Virol*, pp. 1899-911.
- Clapp, L. L. & Patton, J. T. (1991). Rotavirus morphogenesis: domains in the major inner capsid protein essential for binding to single-shelled particles and for trimerization. In *Virology*, pp. 697-708.
- Clausen, J. D., McIntosh, D. B., Vilsen, B., Woolley, D. G. & Andersen, J. P. (2003). Importance of conserved N-domain residues Thr441, Glu442, Lys515, Arg560, and Leu562 of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase for MgATP binding and subsequent catalytic steps. Plasticity of the nucleotide-binding site. In *J Biol Chem*, pp. 20245-58.

- Dong, Y., Zeng, C. Q., Ball, J. M., Estes, M. K. & Morris, A. P. (1997). The rotavirus enterotoxin NSP4 mobilizes intracellular calcium in human intestinal cells by stimulating phospholipase C-mediated inositol 1,4,5-trisphosphate production. In *Proc Natl Acad Sci U S A*, pp. 3960-5.
- Eichwald, C., Vascotto, F., Fabbretti, E. & Burrone, O. R. (2002). Rotavirus NSP5: mapping phosphorylation sites and kinase activation and viroplasm localization domains. In *J Virol*, pp. 3461-70.
- Estes, M. K. (2001). Rotaviruses. In *Fields Fundamental Virology*, 4th edn, pp. 1747-1785. Edited by P. M. Howley. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Press.
- Estes, M. K., Palmer, E. L. & Obijeski, J. F. (1983). Rotaviruses: a review. In *Curr Top Microbiol Immunol*, pp. 123-84.
- Fabbretti, E., Afrikanova, I., Vascotto, F. & Burrone, O. R. (1999). Two non-structural rotavirus proteins, NSP2 and NSP5, form viroplasm-like structures in vivo. In *J Gen Virol*, pp. 333-9.
- Flewett, T. H., Bryden, A. S., Davies, H., Woode, G. N., Bridger, J. C. & Derrick, J. M. (1974). Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. In *Lancet*, pp. 61-3.
- Fuerst, T. R., Niles, E. G., Studier, F. W. & Moss, B. (1986). Eukaryotic transient-expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase. In *Proc Natl Acad Sci U S A*, pp. 8122-6.
- Gallegos, C. O. & Patton, J. T. (1989). Characterization of rotavirus replication intermediates: a model for the assembly of single-shelled particles. In *Virology*, pp. 616-27.
- Gijsbers, R., Ceulemans, H., Stalmans, W. & Bollen, M. (2001). Structural and catalytic similarities between nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases and alkaline phosphatases. In *J Biol Chem*, pp. 1361-8.
- Gillian, A. L. & Nibert, M. L. (1998). Amino terminus of reovirus nonstructural protein sigma NS is important for ssRNA binding and nucleoprotein complex formation. In *Virology*, pp. 1-11.
- Gillian, A. L., Schmechel, S. C., Livny, J., Schiff, L. A. & Nibert, M. L. (2000). Reovirus protein sigmaNS binds in multiple copies to single-stranded RNA and shares properties with single-stranded DNA binding proteins. In *J Virol*, pp. 5939-48.
- Gombold, J. L., Estes, M. K. & Ramig, R. F. (1985). Assignment of simian rotavirus SA11 temperature-sensitive mutant groups B and E to genome segments. In *Virology*, pp. 309-20.
- Gonzalez, R. A., Espinosa, R., Romero, P., Lopez, S. & Arias, C. F. (2000). Relative localization of viroplasmic and endoplasmic reticulum-resident rotavirus proteins in infected cells. In *Arch Virol*, pp. 1963-73.
- Gonzalez, S. A. & Burrone, O. R. (1991). Rotavirus NS26 is modified by addition of single O-linked residues of N-acetylglucosamine. In *Virology*, pp. 8-16.
- Graff, J. W., Mitzel, D. N., Weisend, C. M., Flenniken, M. L. & Hardy, M. E. (2002). Interferon regulatory factor 3 is a cellular partner of rotavirus NSP1. In *J Virol*, pp. 9545-50.
- Helmberger-Jones, M. & Patton, J. T. (1986). Characterization of subviral particles in cells infected with simian rotavirus SA11. In *Virology*, pp. 655-65.

- Hildebrandt, E. & Fried, V. A. (1989). Phosphoamino acid analysis of protein immobilized on polyvinylidene difluoride membrane. In *Anal Biochem*, pp. 407-12.
- Hinrichs, M. V., Jedlicki, A., Tellez, R., Pongor, S., Gatica, M., Allende, C. C. & Allende, J. E. (1993). Activity of recombinant alpha and beta subunits of casein kinase II from *Xenopus laevis*. In *Biochemistry*, pp. 7310-6.
- Horscroft, N. J. & Roy, P. (2000). NTP binding and phosphohydrolase activity associated with purified bluetongue virus non-structural protein NS2. In *J Gen Virol*, pp. 1961-5.
- Hoshino, Y., Sereno, M. M., Midthun, K., Flores, J., Kapikian, A. Z. & Chanock, R. M. (1985). Independent segregation of two antigenic specificities (VP3 and VP7) involved in neutralization of rotavirus infectivity. In *Proc Natl Acad Sci US A*, pp. 8701-4.
- Hsu, G. G., Bellamy, A. R. & Yeager, M. (1997). Projection structure of VP6, the rotavirus inner capsid protein, and comparison with bluetongue VP7. In *J Mol Biol*, pp. 362-8.
- Imai, M., Akatani, K., Ikegami, N. & Furuichi, Y. (1983). Capped and conserved terminal structures in human rotavirus genome double-stranded RNA segments. In *J Virol*, pp. 125-36.
- Jayaram, H., Taraporewala, Z., Patton, J. T. & Prasad, B. V. (2002). Rotavirus protein involved in genome replication and packaging exhibits a HIT-like fold. In *Nature*, pp. 311-5.
- Kapahnke, R., Rappold, W., Desselberger, U. & Riesner, D. (1986). The stiffness of dsRNA: hydrodynamic studies on fluorescence-labelled RNA segments of bovine rotavirus. In *Nucleic Acids Res*, pp. 3215-28.
- Kapikian, A. Z. (2001). A rotavirus vaccine for prevention of severe diarrhoea of infants and young children: development, utilization and withdrawal. In *Novartis Found Symp*, pp. 153-71; discussion 171-9.
- Kapikian, A. Z., Hoshino, Y. & Chanock, R. M. (2001). Rotaviruses. In *Fields Fundamental Virology*, 4th edn, pp. 1787-1833. Edited by P. M. Howley. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Press.
- Kapikian, A. Z., Kim, H. W., Wyatt, R. G., Rodriguez, W. J., Ross, S., Cline, W. L., Parrott, R. H. & Chanock, R. M. (1974). Reoviruslike agent in stools: association with infantile diarrhea and development of serologic tests. In *Science*, pp. 1049-53.
- Kim, J., Parker, J. S., Murray, K. E. & Nibert, M. L. (2004). Nucleoside and RNA triphosphatase activities of orthoreovirus transcriptase cofactor mu2. In *J Biol Chem*, pp. 4394-403.
- Klumpp, S. & Krieglstein, J. (2002). Phosphorylation and dephosphorylation of histidine residues in proteins. In *Eur J Biochem*, pp. 1067-71.
- Labbe, M., Baudoux, P., Charpilienne, A., Poncet, D. & Cohen, J. (1994). Identification of the nucleic acid binding domain of the rotavirus VP2 protein. In *J Gen Virol*, pp. 3423-30.
- Lawton, J. A., Estes, M. K. & Prasad, B. V. (1997a). Three-dimensional visualization of mRNA release from actively transcribing rotavirus particles. In *Nat Struct Biol*, pp. 118-21.

- Lawton, J. A., Zeng, C. Q., Mukherjee, S. K., Cohen, J., Estes, M. K. & Prasad, B. V. (1997b). Three-dimensional structural analysis of recombinant rotavirus-like particles with intact and amino-terminal-deleted VP2: implications for the architecture of the VP2 capsid layer. In *J Virol*, pp. 7353-60.
- Lima, C. D., Klein, M. G. & Hendrickson, W. A. (1997). Structure-based analysis of catalysis and substrate definition in the HIT protein family. In *Science*, pp. 286-90.
- Litchfield, D. W., Lozeman, F. J., Cicirelli, M. F., Harrylock, M., Ericsson, L. H., Piening, C. J. & Krebs, E. G. (1991). Phosphorylation of the beta subunit of casein kinase II in human A431 cells. Identification of the autophosphorylation site and a site phosphorylated by p34cdc2. In *J Biol Chem*, pp. 20380-9.
- Liu, M., Mattion, N. M. & Estes, M. K. (1992). Rotavirus VP3 expressed in insect cells possesses guanylyltransferase activity. In *Virology*, pp. 77-84.
- Lopez, S. & Arias, C. F. (2004). Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. *Trends Microbiol* 12, 271-8.
- Mbisa, J. L., Becker, M. M., Zou, S., Dermody, T. S. & Brown, E. G. (2000). Reovirus mu2 protein determines strain-specific differences in the rate of viral inclusion formation in L929 cells. In *Virology*, pp. 16-26.
- McCrae, M. A. & McCorquodale, J. G. (1983). Molecular biology of rotaviruses. V. Terminal structure of viral RNA species. In *Virology*, pp. 204-12.
- McIntosh, D. B., Clausen, J. D., Woolley, D. G., MacLennan, D. H., Vilsen, B. & Andersen, J. P. (2003). ATP binding residues of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. In *Ann N Y Acad Sci*, pp. 101-5.
- McIntosh, D. B., Woolley, D. G., Vilsen, B. & Andersen, J. P. (1996). Mutagenesis of segment 487Phe-Ser-Arg-Asp-Arg-Lys492 of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase produces pumps defective in ATP binding. In *J Biol Chem*, pp. 25778-89.
- Mitchell, D. B. & Both, G. W. (1988). Simian rotavirus SA11 segment 11 contains overlapping reading frames. In *Nucleic Acids Res*, pp. 6244.
- Mitchell, D. B. & Both, G. W. (1990). Completion of the genomic sequence of the simian rotavirus SA11: nucleotide sequences of segments 1, 2, and 3. In *Virology*, pp. 324-31.
- Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K. & Olson, A. J. (1998). Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. In *J Comp Chem*, pp. 1639-62.
- Nakata, S., Estes, M. K., Graham, D. Y., Loosle, R., Tao, H., Wang, S. H., Saif, L. J. & Melnick, J. L. (1986). Antigenic characterization and ELISA detection of adult diarrhea rotaviruses. In *J Infect Dis*, pp. 448-55.
- Ozvegy, C., Varadi, A. & Sarkadi, B. (2002). Characterization of drug transport, ATP hydrolysis, and nucleotide trapping by the human ABCG2 multidrug transporter. Modulation of substrate specificity by a point mutation. In *J Biol Chem*, pp. 47980-90.
- Parashar, U. D., Hummelman, E. G., Bresee, J. S., Miller, M. A. & Glass, R. I. (2003). Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. In *Emerg Infect Dis*, pp. 565-72.
- Patton, J. T. (1990). Evidence for equimolar synthesis of double-strand RNA and minus-strand RNA in rotavirus-infected cells. In *Virus Res*, pp. 199-208.

- Patton, J. T. (1995). Structure and function of the rotavirus RNA-binding proteins. In *J Gen Virol*, pp. 2633-44.
- Patton, J. T. & Gallegos, C. O. (1990). Rotavirus RNA replication: single-stranded RNA extends from the replicase particle. In *J Gen Virol*, pp. 1087-94.
- Patton, J. T. & Spencer, E. (2000). Genome replication and packaging of segmented double-stranded RNA viruses. In *Virology*, pp. 217-25.
- Patton, J. T., Wentz, M., Xiaobo, J. & Ramig, R. F. (1996). cis-Acting signals that promote genome replication in rotavirus mRNA. In *J Virol*, pp. 3961-71.
- Pelton, P. D. & Ganzhorn, A. J. (1992). The effect of histidine modification on the activity of myo-inositol monophosphatase from bovine brain. *J Biol Chem* **267**, 5916-20.
- Petrie, B. L., Graham, D. Y., Hanssen, H. & Estes, M. K. (1982). Localization of rotavirus antigens in infected cells by ultrastructural immunocytochemistry. In *J Gen Virol*, pp. 457-67.
- Petrie, B. L., Greenberg, H. B., Graham, D. Y. & Estes, M. K. (1984). Ultrastructural localization of rotavirus antigens using colloidal gold. In *Virus Res*, pp. 133-52.
- Piron, M., Vende, P., Cohen, J. & Poncet, D. (1998). Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4G1 and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F. In *Embo J*, pp. 5811-21.
- Pizarro, J. L., Sandino, A. M., Pizarro, J. M., Fernandez, J. & Spencer, E. (1991). Characterization of rotavirus guanylyltransferase activity associated with polypeptide VP3. In *J Gen Virol*, pp. 325-32.
- Poncet, D., Laurent, S. & Cohen, J. (1994). Four nucleotides are the minimal requirement for RNA recognition by rotavirus non-structural protein NSP3. In *Embo J*, pp. 4165-73.
- Poncet, D., Lindenbaum, P., L'Haridon, R. & Cohen, J. (1997). In vivo and in vitro phosphorylation of rotavirus NSP5 correlates with its localization in viroplasm. In *J Virol*, pp. 34-41.
- Prasad, B. V., Rothnagel, R., Zeng, C. Q., Jakana, J., Lawton, J. A., Chiu, W. & Estes, M. K. (1996). Visualization of ordered genomic RNA and localization of transcriptional complexes in rotavirus. In *Nature*, pp. 471-3.
- Prasad, B. V., Wang, G. J., Clerx, J. P. & Chiu, W. (1988). Three-dimensional structure of rotavirus. In *J Mol Biol*, pp. 269-75.
- Ramig, R. F. & Petrie, B. L. (1984). Characterization of temperature-sensitive mutants of simian rotavirus SA11: protein synthesis and morphogenesis. In *J Virol*, pp. 665-73.
- Sanchez-San Martin, C., Lopez, T., Arias, C. F. & Lopez, S. (2004). Characterization of rotavirus cell entry. In *J Virol*, pp. 2310-8.
- Sandino, A. M., Jashes, M., Faundez, G. & Spencer, E. (1986). Role of the inner protein capsid on in vitro human rotavirus transcription. In *J Virol*, pp. 797-802.
- Schuck, P., Taraporewala, Z., McPhie, P. & Patton, J. T. (2001). Rotavirus nonstructural protein NSP2 self-assembles into octamers that undergo ligand-induced conformational changes. In *J Biol Chem*, pp. 9679-87.
- Shaw, A. L., Rothnagel, R., Chen, D., Ramig, R. F., Chiu, W. & Prasad, B. V. (1993). Three-dimensional visualization of the rotavirus hemagglutinin structure. In *Cell*, pp. 693-701.

- Shuman, S. (2001). Structure, mechanism, and evolution of the mRNA capping apparatus. In *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, pp. 1-40.
- Soler, C., Musalem, C., Lorono, M. & Espejo, R. T. (1982). Association of viral particles and viral proteins with membranes in SA11-infected cells. In *J Virol*, pp. 983-92.
- Taniguchi, K., Kojima, K., Kobayashi, N., Urasawa, T. & Urasawa, S. (1996). Structure and function of rotavirus NSP1. In *Arch Virol Suppl*, pp. 53-8.
- Taraporewala, Z., Chen, D. & Patton, J. T. (1999). Multimers formed by the rotavirus nonstructural protein NSP2 bind to RNA and have nucleoside triphosphatase activity. In *J Virol*, pp. 9934-43.
- Taraporewala, Z. F., Chen, D. & Patton, J. T. (2001). Multimers of the bluetongue virus nonstructural protein, NS2, possess nucleotidyl phosphatase activity: similarities between NS2 and rotavirus NSP2. In *Virology*, pp. 221-31.
- Taraporewala, Z. F. & Patton, J. T. (2001). Identification and characterization of the helix-destabilizing activity of rotavirus nonstructural protein NSP2. In *J Virol*, pp. 4519-27.
- Taraporewala, Z. F., Schuck, P., Ramig, R. F., Silvestri, L. & Patton, J. T. (2002). Analysis of a temperature-sensitive mutant rotavirus indicates that NSP2 octamers are the functional form of the protein. In *J Virol*, pp. 7082-93.
- Taylor, J. A., O'Brien, J. A. & Yeager, M. (1996). The cytoplasmic tail of NSP4, the endoplasmic reticulum-localized non-structural glycoprotein of rotavirus, contains distinct virus binding and coiled coil domains. In *Embo J*, pp. 4469-76.
- Thomas, C. P., Booth, T. F. & Roy, P. (1990). Synthesis of bluetongue virus-encoded phosphoprotein and formation of inclusion bodies by recombinant baculovirus in insect cells: it binds the single-stranded RNA species. In *J Gen Virol*, pp. 2073-83.
- Tihova, M., Dryden, K. A., Bellamy, A. R., Greenberg, H. B. & Yeager, M. (2001). Localization of membrane permeabilization and receptor binding sites on the VP4 hemagglutinin of rotavirus: implications for cell entry. In *J Mol Biol*, pp. 985-92.
- Torres-Vega, M. A., Gonzalez, R. A., Duarte, M., Poncet, D., Lopez, S. & Arias, C. F. (2000). The C-terminal domain of rotavirus NSP5 is essential for its multimerization, hyperphosphorylation and interaction with NSP6. In *J Gen Virol*, pp. 821-30.
- Uitenweerde, J. M., Theron, J., Stoltz, M. A. & Huismans, H. (1995). The multimeric nonstructural NS2 proteins of bluetongue virus, African horsesickness virus, and epizootic hemorrhagic disease virus differ in their single-stranded RNA-binding ability. In *Virology*, pp. 624-32.
- Valenzuela, S., Pizarro, J., Sandino, A. M., Vasquez, M., Fernandez, J., Hernandez, O., Patton, J. & Spencer, E. (1991). Photoaffinity labeling of rotavirus VP1 with 8-azido-ATP: identification of the viral RNA polymerase. In *J Virol*, pp. 3964-7.
- Vende, P., Piron, M., Castagne, N. & Poncet, D. (2000). Efficient translation of rotavirus mRNA requires simultaneous interaction of NSP3 with the eukaryotic translation initiation factor eIF4G and the mRNA 3' end. In *J Virol*, pp. 7064-71.
- Vende, P., Taraporewala, Z. F. & Patton, J. T. (2002). RNA-binding activity of the rotavirus phosphoprotein NSP5 includes affinity for double-stranded RNA. In *J Virol*, pp. 5291-9.

- Wentz, M. J., Patton, J. T. & Ramig, R. F. (1996a). The 3'-terminal consensus sequence of rotavirus mRNA is the minimal promoter of negative-strand RNA synthesis. In *J Virol*, pp. 7833-41.
- Wentz, M. J., Zeng, C. Q., Patton, J. T., Estes, M. K. & Ramig, R. F. (1996b). Identification of the minimal replicase and the minimal promoter of (-)-strand synthesis, functional in rotavirus RNA replication in vitro. In *Arch Virol Suppl*, pp. 59-67.
- Yeager, M., Berriman, J. A., Baker, T. S. & Bellamy, A. R. (1994). Three-dimensional structure of the rotavirus haemagglutinin VP4 by cryo-electron microscopy and difference map analysis. In *Embo J*, pp. 1011-8.
- Yeager, M., Dryden, K. A., Olson, N. H., Greenberg, H. B. & Baker, T. S. (1990). Three-dimensional structure of rhesus rotavirus by cryoelectron microscopy and image reconstruction. In *J Cell Biol*, pp. 2133-44.