

UCH-FC
Doc-Microbiología
Q 488
C.1

**“ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE LA POLIMERASA DE
ROTAVIRUS VP1 CON EL TEMPLADO DE RNA Y LAS
PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES NSP2 Y NSP5”**

Tesis

Entregada A 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

Alba Esther del Rosario Ricardo Páez

Enero, 2010

Director de Tesis

Dr. Eugenio Spencer Ossa

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato.

ALBA ESTHER DEL ROSARIO RICARDO PÁEZ

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 8 de mayo del 2009.

Director de Tesis:

Dr. Eugenio Spencer

Comisión de Evaluación de Tesis

Dr. Octavio Monasterio

Dr. Jonás Chnaiderman

Dr. Marcelo López



The image shows three handwritten signatures in blue ink, each written over a horizontal dashed line. The signatures are: 1) A large, stylized signature that appears to be 'E. Spencer'. 2) A signature that appears to be 'Octavio Monasterio'. 3) A signature that appears to be 'Jonás Chnaiderman'. To the right of the signatures is a circular purple stamp with the text 'FACULTAD DE CIENCIAS', 'BIBLIOTECA CENTRAL', and 'UNIVERSIDAD DE CHILE'.



*"Avanzo con el auto sumergido en tan
espesa niebla que no veo la ruta.
Conduzco por intuición del camino
pero, inexplicablemente, no me equivoco.
Ningún par de faros me cruza
desde hace rato y se me ocurre que la
ruta existe debajo del coche sólo porque
yo creo en ella.
Ahora la niebla comienza a disiparse.
Los faros iluminan
apenas la ondulante extensión gris que
transito.
Primero una gaviota y luego un pez
volador pasan por delante
del parabrisas. Sigo creyendo en la ruta.
Tengo que poder".*

Raúl Brasca

*"Si queremos un mundo de paz y de
justicia hay que poner decididamente la inteligencia al servicio
del amor".*

Antoine de Saint-Exupery



Alba Ricardo Páez es originaria de Tolú, Colombia. La cercanía del mar y la riqueza natural del Caribe hicieron inevitable un interés temprano por las ciencias biológicas. Realizó los estudios universitarios de Microbiología en la Universidad de Pamplona, Colombia. Estuvo vinculada en un proyecto sobre Biocombustibles en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional en Bogotá. Posteriormente se ganó una beca DAAD del gobierno alemán, para realizar un doctorado en la Universidad de Chile. Durante el transcurso del doctorado hizo una estadía en el Instituto Friedrich Loeffler en Riems, Alemania. Su interés es seguir trabajando en el campo de la Virología y la Biología Celular.



AGRADECIMIENTOS

A mis padres Juanita y Calixto, mis tres hermanos: Jorge, Juan Carlos y Javier, gracias por su apoyo y amor incondicional. Soy muy afortunada de tenerlos. A Dios por convertir los sueños en realidades.

Mis tías, tíos, primos y primas (es una larga lista de nombres), gracias por su preocupación, ánimo y cariño.

A mi tutor Dr. Eugenio Spencer Ossa, gracias por abrirme las puertas de su laboratorio y por sus enseñanzas, apoyadas en una invaluable calidad científica y humana.

A la Dra. Ana María Sandino gracias por sus consejos y apoyo constante durante la realización de esta tesis.

Al Dr. Jorge Pavez por su valiosa colaboración, horas de dedicación en los experimentos de AFM y sobretodo por su calidez personal.

Al DAAD por la oportunidad brindada para la realización de este doctorado.

A mis amigas Saddys, Rosita, Cristina, Maite y Nayibe mil gracias por las risas compartidas, por sus consejos, constante preocupación y por escuchar a pesar del cansancio ("*Las huellas de las personas que caminaron juntas nunca se borran*").

A mis amigas en Colombia Lisbeth, Zuly, Angélica, Beatriz, Felisa, Miriam, Angela, Sonny, Hilda y Mónica, gracias por su cariño y ánimo constante.

A Tere por su amistad y apoyo fundamental en la realización de esta tesis.

Gracias por las horas compartidas en el laboratorio de Virología de la USACH y por su amistad a Patricio, Claudia, Patricia y Ruth. También quiero agradecer a Lucia, Fernando, Anita, Alvaro, Loredana, Marcela, Jorge, Guido, Tamara, Mónica, Johanna, Rodrigo, David, Eduardo, Eva, David G. y Julio. Al laboratorio de Inmunología de la USACH, en especial a la Dra. Mónica Imarai, Carolina y Sebastián. A Don Oscar por la preparación del material del laboratorio.

En Alemania a las personas del Instituto Friedrich Loeffler, mil gracias al Dr. Egbert Mundt, Tobías, Anja, Kerstin, Axel, Angela, Dietlig.

A mis compañeros del doctorado Aniela, Jota, Verónica, Jae y Felipe, gracias por las horas compartidas.

Gracias a las personas del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional en Bogotá, siempre los recuerdo con mucho cariño.

A los miembros de la comisión por su ayuda, valioso aporte y preocupación durante la realización de esta tesis.





INDICE

	Página
1. LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	
2. RESUMEN	1
3. SUMMARY	4
4. INTRODUCCIÓN	7
4.1. Epidemiología e importancia del rotavirus.	7
4.2. Generalidades del rotavirus.	9
4.3. Estructura de la partícula viral.	10
4.4. Ciclo infectivo.	16
4.5. Proteína VP1.	20
4.6. Proteína NSP2.	26
4.7. Proteína NSP5.	30
4.8. Introducción a la Microscopía de Fuerza Atómica.	31
4.9. Antecedentes del trabajo.	35
5. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	41
6. MATERIALES Y MÉTODOS	42



6.1.	Cultivo celular.	42
6.2.	Construcción del baculovirus recombinante rBV-VP1.	42
6.3.	Expresión y purificación de la proteína recombinante VP1.	45
6.4.	Expresión y purificación de las proteínas NSP2 y NSP5.	46
6.5.	Preparación de los templados para transcripción <i>in vitro</i> .	48
6.6.	Preparación de las muestras para AFM.	49
6.7.	Condiciones de medida del AFM.	50
7.	RESULTADOS	51
7.1.	Purificación de las proteínas VP1, NSP2 y NSP5.	51
7.2.	Obtención de ssRNAs mediante transcripción <i>in vitro</i> .	55
7.3.	Determinar si la unión de VP1 al RNA templado depende de una secuencia en particular.	58

7.4. Estudio de complejos individuales de NSP2 y NSP5	
mediante AFM.	77
7.5. Estudio de la interacción de NSP2 y NSP5 con el ssRNA	
templado.	88
8. DISCUSIÓN	95
9. CONCLUSIONES	107
10. BIBLIOGRAFÍA	109



LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Arquitectura de la partícula del rotavirus.	11
Figura 2. Ciclo viral de rotavirus.	18
Figura 3. Estructura y organización de la polimerasa del rotavirus, VP1.	22
Figura 4. Elementos principales de un Microscopio de Fuerza Atómica.	34
Figura 5. Esquema del sistema de expresión “Bac-to-Bac”.	44
Figura 5a. Expresión y purificación de la proteína VP1.	52
Figura 5b. Expresión y purificación de la proteína NSP5.	53
Figura 5c. Expresión y purificación de la proteína NSP2.	54
Figura 6a. Productos de transcripción “<i>in vitro</i>”.	56
Figura 6b. Esquema de los diferentes transcritos del gen 8 del rotavirus.	57
Figura 7. Imagen en 3D del transcrito completo del gen 8 del rotavirus.	62
Figura 8. Imagen de la polimerasa del rotavirus, VP1.	63

Figura 9.	Análisis seccional de la polimerasa VP1.	64
Figura 10.	Imagen en 3D de la proteína VP1 con el ssRNA del gen 8 del rotavirus truncado en el 5'.	65
Figura 11.	Estructura secundaria del ssRNA del gen 8 del rotavirus obtenida mediante el programa MPGAfold.	66
Figura 12.	Imagen en 3D del ssRNA del gen 8 completo y VP1.	67
Figura 13.	Imagen en 3D del ssRNA del gen 8 completo y VP1.	69
Figuras 14-16.	Análisis seccional de complejos de VP1 con el ssRNA del gen 8 completo del rotavirus.	70-74
Figura 17.	Imagen en 3D de la proteína VP1 con el ssRNA del gen 8 del rotavirus truncado en el 3'.	76
Figura 18.	Imagen en 3D de la proteína NSP5.	80
Figura 19.	Análisis seccional de la proteína NSP5.	81
Figura 20.	Imagen en 3D de la proteína NSP2 obtenida mediante AFM.	82
Figura 21.	Análisis seccional de la proteína NSP2.	83
Figura 22.	Imagen en 2D de los complejos NSP2 y NSP5.	85

Figura 23.	Imagen en 3D de los complejos NSP2-NSP5 visualizados mediante AFM.	86
Figura 24.	Análisis seccional del complejo NSP2-NSP5.	87
Figura 25.	Imagen en 3D de NSP5 con el ssRNA.	91
Figura 26.	Imagen en 3D de la proteína NSP5 con dsRNA.	92
Figura 27.	Imagen en 2D de complejos de NSP2 con el ssRNA.	93
Figura 28.	Imagen en 3D de los complejos de NSP2-NSP5 y el ssRNA.	94
Figura 29.	Modelo de los eventos iniciales en la morfogénesis del rotavirus.	106

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Cuantificación de las principales conformaciones adoptadas por el transcrito del RNA correspondiente al gen 8 del rotavirus y visualizadas mediante AFM.	68

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

AFM:	Microscopía de Fuerza Atómica.
3' CS:	Secuencia consenso del extremo 3' del RNA templado.
5' CS:	Secuencia consenso del extremo 5 del RNA templado.
C-terminal:	Carboxi terminal.
DEPC:	Dietilpirocarbonato.
dsRNA:	RNA de doble hebra.
DTT:	Ditiotreitol.
MOI:	Multiplicidad de infección.
N-terminal:	Amino terminal.
NTP:	Nucleótido trifosfato.
PDC:	Partícula de doble cubierta.
PBS:	Tampón fosfato salino.
rBV:	Baculovirus recombinante.
RI:	Intermediario de replicación.
ssRNA:	RNA de hebra simple.
TLP:	Partícula de triple cubierta.

RESUMEN

El rotavirus miembro de la familia *Reoviridae*, es un virus con 11 segmentos de RNA de doble hebra y es el agente principal causante de la diarrea en niños menores de cinco años. El rotavirus es aún un problema de salud a nivel mundial, responsable de 600.000 muertes anuales, presentándose estos eventos fatales en su mayoría en países en vías de desarrollo.

La etapa de replicación y encapsidación del genoma de rotavirus ocurre en los llamados viroplasmos, estos son estructuras electrodensas presentes en el citoplasma de células infectadas. Las proteínas claves en la formación de los viroplasmos son dos proteínas no estructurales (NS), NSP2 y NSP5.

NSP5 es una proteína codificada por el gen 11 de rotavirus. Es una proteína dimérica que en las células infectadas es fosforilada y glicosilada. NSP5 tiene afinidad por RNA de simple (ssRNA) y doble hebra (dsRNA).

NSP2 es una proteína básica de 35 kDa y posee una estructura octamérica, la cual es su forma biológicamente activa. Dentro de las funciones descritas para NSP2 se encuentran: actividad desestabilizadora de doble hélice, NTPasa y RTPasa. NSP2 une de manera inespecífica ssRNA.

Aún no es muy claro el papel de NSP5 en el ciclo viral, se sabe que las dos proteínas NS son esenciales en la replicación del genoma viral.

VP1 es una proteína de 125 kDa y es la polimerasa viral RNA dependiente (RdRP), tiene la capacidad de unirse de manera inespecífica al extremo 3' del RNA templado viral, pero necesita de la proteína VP2 para su actividad replicasa.

Se sabe que NSP2 y NSP5 interactúan con la polimerasa de rotavirus, VP1. Además estas tres proteínas están presentes en los viroplasmos y forman parte de los intermediarios de replicación, RI.

En la morfogénesis del rotavirus los eventos concernientes a la encapsidación y posterior replicación del genoma viral no están plenamente dilucidados. Por consiguiente en este trabajo proponemos un método de estudio *in vitro*, con las proteínas involucradas en las primeras etapas de la morfogénesis del rotavirus: NSP2, NSP5, VP1 y el RNA templado. Visualizamos la formación de complejos individuales de ssRNA-proteína o proteína-proteína (para el caso de las NS), mediante microscopía de fuerza atómica, AFM.

La ventaja de esta técnica permitió usar la molécula completa de un transcrito del gen 8 de rotavirus (1.058 nucleótidos) y observar de manera directa una conformación muy particular que llamamos forma de Y. Uno de nuestros resultados mas interesantes se obtuvieron con los complejos formados por VP1 y la molécula completa del ssRNA del gen 8 de rotavirus, en donde aparece la proteína VP1 unida a sitios específicos del RNA en forma de Y, las cuales involucraron no solo regiones del extremo 3', sino también regiones no conservadas del ssRNA, estas últimas pueden ser la clave en la encapsidación del ssRNA.

Los análisis de las proteínas NS con el ssRNA mostraron diferencias en el modo de unirse de estas proteínas en el templado de RNA, en donde NSP2 se distribuyó a lo largo de la molécula del RNA cubriéndola casi en su totalidad.

Esta forma de unión de NSP2 al ssRNA, se asocia a una actividad desestabilizadora de doble hélice previamente reportada.

NSP5 produjo un efecto de compactación en el ssRNA y/o agregación, en contraste a los ensayos de NSP5 con el dsRNA genómico del rotavirus, en donde la proteína se distribuyó de forma continua en el dsRNA de manera similar a las cuentas de un collar. Esta última observación posibilita la hipótesis que NSP5 evita la detección en la célula hospedadora del dsRNA viral. También se observó una agregación del ssRNA al interactuar simultáneamente con las proteínas NSP2-5, lo cual no permitió evidenciar si los sitios ocupados por VP1 en el ssRNA en forma de Y, eran comunes a las proteínas NS. En ausencia del ssRNA templado, los complejos de NSP2-NSP5 no formaron agregados, en cambio aparecieron complejos donde sólo monómero del dímero de NSP5 se unió al octámero de NSP2.

SUMMARY

The rotavirus of the family *Reoviridae* is a virus with 11 double-stranded RNA segments and is the main causing agent of diarrhea in children that are less than five years old. This rotavirus is still a health problem worldwide, and is responsible for 600,000 deaths per year, being most fatal in developing countries.

The replication and packaging stage of the viral genome occurs in the so-called viroplasm, which are electron-dense structures present in the cytoplasm of infected cells. The key proteins in the formation of the viroplasm are two non-structural (NS) proteins, NSP2 and NSP5.

NSP5 is a protein coded by gene 11 of rotavirus. It is a dimeric protein that is phosphorylated and glycosylated in infected cells. NSP5 has affinity for single and double-stranded RNA.

NSP2 is a basic 35 kDa protein shaped as an octamer, and is biologically active. The functions described for NSP2 include: double helix-destabilizing activity, NTPase and RTPase. NSP2 possess sequence independent affinity for single stranded ssRNA.

Even though the role of NSP5 in the viral cycle is not yet clear, it is well known that both NS proteins are essential for the replication of viral genome.

VP1 is a 125 kDa protein and is an RNA-dependant polymerase (RdRP), which can specifically binds to the 3' end of the RNA template, but needs the VP2 protein for its replicase activity.

It is known that NSP2 and NSP5 interact with the viral polymerase VP1. In addition, these three proteins are present in the viroplasm and are part of the replication intermediaries, RI.

In the rotavirus morphogenesis the events concerning packaging and later replication of the viral genome are not fully understood. Here we propose an *in vitro* study method with the proteins involved in the first stages of rotavirus morphogenesis: NSP2, NSP5, VP1 and the template RNA. The interaction of the individual ssRNA-protein or protein-protein (in the case of NS) complexes was visualized, through atomic force microscopy (AFM).

The advantage of this technique was that it allowed to use the complete molecule of a transcript of the rotavirus gene 8 (1058 nucleotides) and directly observe a very particular conformation that was called Y shape. Some of the most interesting results were obtained with the complexes formed by VP1 and the full ssRNA of gene 8, in which VP1 appears bound to specific sites in the RNA in a Y shape, apparently involving 3' end regions conserved and non conserved.

The analyses of NS proteins with the ssRNA showed differences in the binding of these proteins with the RNA template, where NSP2 is distributed throughout the length of the RNA molecule, covering it almost completely. This binding mode is probably due to its helix-destabilizing activity.

NSP5 caused a compacting or aggregation effect in the RNA that made the complexes difficult to study. In contrast the NSP5-dsRNA complexes suggest the possible function of NSP5 to prevent the detection of dsRNA in infected cell.

The NSP5/NSP2/ssRNA complexes also caused aggregation, thus it was not possible to determine with certainty whether the sites occupied by VP1 in the ssRNA were common to the NS proteins.

INTRODUCCIÓN

1. Epidemiología e importancia del rotavirus

Rotavirus es el agente etiológico de la diarrea severa en niños menores de 5 años. Cada año este virus, causa aproximadamente 111 millones de episodios de gastroenteritis, 25 millones de visitas clínicas, 2 millones de hospitalizaciones y 600.000 muertes alrededor del mundo (Parashar y col., 2003; Glass y col., 2006). En Latinoamérica el rotavirus es responsable anualmente de 15.000 muertes y 75.000 hospitalizaciones. Aunque la frecuencia de infección es similar, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo, el 82% de las muertes ocurre en estos últimos (Pérez-Vargas y col., 2006).

Hasta el presente el rotavirus es aún un problema serio de salud pública a nivel mundial, por este motivo el desarrollo de una vacuna brinda una oportunidad única, para reducir los costos sociales y médicos de esta enfermedad.

La primera vacuna del rotavirus autorizada en Estados Unidos, llamada Rotashield^R (Wyeth, Laboratories), se obtuvo a partir de cepas virales de origen humano y de simio (Kapikian y col., 1996). Posterior a la inclusión de esta vacuna en los programas de inmunización, se dieron a conocer casos de invaginación intestinal en infantes, en especial dentro de la semana inmediata a la administración de la vacuna (Murphy y col., 2001). Este efecto adverso obligó la suspensión de la vacuna Rotashield^R en los Estados Unidos. En la actualidad, existen en el mercado una nueva generación de vacunas del rotavirus.

La vacuna Rotarix de GlaxoSmithKline (GSK), realizada a partir de una cepa de rotavirus humano, correspondió al genotipo más representativo y común en humanos, el G1P[8]. La atenuación de esta cepa hecha por pasajes sucesivos, pasó a una etapa de evaluación al ser administrada en 60.000 infantes y así evitar posibles eventos de invaginación intestinal o intususcepción (Angel y col., 2007).

Rotateq (Merck) corresponde a una cepa monovalente bovina atenuada. Para mejorar la efectividad de la vacuna contra la diversidad de los serotipos comunes, se construyó una cepa reordenante, la cual contiene diez genes de la cepa bovina parental y un gen individual correspondiente a la cápside del serotipo humano más común (Arvin y Greenber, 2006; Glass y col., 2006). Esta vacuna al igual que la cepa de GSK no presentó ningún caso de intususcepción en niños.

Aunque las vacunas Rotarix y Rotateq, han sido introducidas en los esquemas de vacunación infantil de algunos países desarrollados y en vías de desarrollo, se desconoce aún el impacto de las inmunizaciones contra el rotavirus en estos países (Desselberger y col., 2009). De igual manera no se han realizado ensayos de la eficacia de estas vacunas en países de África o Asia (Glass y col., 2006). Los países más pobres afectados por el rotavirus, deben sobrellevar diversos problemas con lo cual destacamos los costos de las vacunas; factores biológicos como malnutrición infantil o la presencia de enfermedades que pueden interferir con la respuesta inmune del infante a la vacuna; prevalencia de cepas locales de rotavirus, contra las cuales la vacuna quizás no ofrezca una protección eficaz (Glass y col., 2006).

Diversos estudios epidemiológicos, han arrojado información acerca de la distribución y prevalencia de los diferentes genotipos del rotavirus. Antes de 1995 los genotipos más frecuentes en humanos eran los G1P[8], G2P[4], G3P[8] y G4P[8] (Estes y Kapikian., 2007). Desde mediados de 1990 y 2000 han emergido los genotipos G9 y G12 respectivamente (Rahman y col., 2008). Otros serotipos del rotavirus que se han vuelto global o regionalmente importantes son el G5 y G8 (Pérez-Vargas y col., 2006). Un aspecto interesante es la producción regional de vacunas, esto puede resultar en un producto no sólo más económico, sino efectivo contra cepas de los rotavirus circulantes de cada país (Pérez-Vargas y col., 2006).

1.1 Generalidades de rotavirus

El rotavirus contiene un genoma de RNA de doble hebra (dsRNA) y es miembro de la familia *Reoviridae*. Los virus con genomas de dsRNA están agrupados en seis familias: *Reoviridae*, *Birnaviridae*, *Totiviridae*, *Partiviridae*, *Hypoviridae* y *Cystoviridae* (Estes, 2001). La familia *Reoviridae* la componen los siguientes géneros: *Orthoreovirus*, *Orbivirus*, *Rotavirus*, *Coltivirus*, *Aquareovirus*, *Cypovirus*, *Fijivirus*, *Phytoreovirus*, *Oryzavirus*, *Seadornavirus*, *Idnoreovirus* y *Mycoreovirus* (Matthijssens y col., 2008). Los genomas de estos virus tienen 10 a 12 segmentos de dsRNA. Los viriones maduros carecen de envoltura, la cápside la forman proteínas múltiples, tienen simetría icosaédrica y se ordenan de manera general en cubiertas concéntricas. Una característica de los virus de dsRNA, independientemente de su asociación familiar, es la habilidad para llevar a cabo la transcripción de los segmentos de dsRNA, bajo condiciones óptimas, dentro de la cápside.

Tanto la transcripción y la síntesis posterior de dsRNA genómico se realiza en un ambiente confinado, para evitar no solo la degradación del genoma por nucleasas celulares, sino para prevenir la respuesta antiviral en la célula hospedera. En todos estos virus, las enzimas requeridas para la transcripción endógena forman parte de la estructura del virión (Jayaram y col., 2004).

1.2. Estructura de la partícula viral

El genoma del rotavirus consiste de 11 segmentos de dsRNA. Cada segmento del genoma codifica para una proteína, exceptuando el segmento 11, el cual codifica para dos proteínas (Estes y Kapikian., 2007). Entre las doce proteínas, seis son estructurales (VPs) y seis son no estructurales (NSPs). Los estudios de criomicroscopía electrónica han determinado, que la partícula viral de rotavirus es de triple cubierta e icosaédrica y de aproximadamente 1000 Å de diámetro (Prasad y col., 1988; Prasad y col., 1990; Yeager y col., 1990; Prasad y col., 1996). El virión completo es llamado una partícula de triple cubierta (TLP). Igual a muchos miembros de la familia *Reoviridae*, la arquitectura de la cápside está basada en la simetría icosaédrica T=13. Contiene además 132 canales porosos, los cuales permiten la entrada de compuestos en solución acuosa hasta el interior de la cápside y la salida de mRNAs recién sintetizados (Estes, 2001). Las características principales de la cápside madura del rotavirus se muestran en la figura 1.

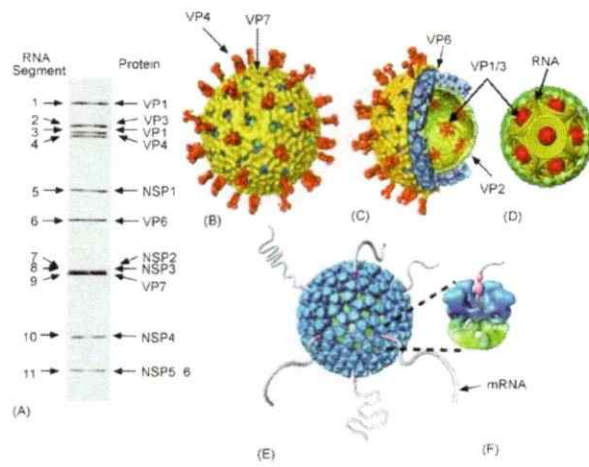


Figura 1. Arquitectura de la partícula del rotavirus y organización del genoma viral.

Figura 1. Arquitectura de la partícula del rotavirus y organización del genoma viral. **A.** Se muestran los 11 segmentos de dsRNA genómico del rotavirus, resueltos en un gel de poliacrilamida. A la izquierda están numerados los segmentos de los genes y a la derecha las proteínas que ellos codifican. **B.** Estructura tridimensional de una partícula madura del rotavirus, obtenida a partir de criomicroscopía electrónica. En rojo se observa la proteína de la espícula, VP4 y en amarillo la proteína VP7. **C.** Vista de un corte realizado al virión del rotavirus, se muestra la cubierta intermedia VP6 (azul) y la cubierta de VP2 (verde). Las enzimas transcripcionales (VP1/3), representadas en color rojo, se encuentran ancladas a la cubierta de VP2. **D.** Organización esquemática del genoma del rotavirus. Los segmentos del genoma se representan como espirales cónicas invertidos, estos rodean las enzimas de la transcripción (círculos rojos) dentro de la cubierta de VP2 (verde). **E y F.** Modelo de la reconstrucción de la criomicroscopía electrónica de las PDC. La transcripción endógena resulta en la liberación simultánea de los transcritos de mRNA a través de los canales localizados en los vértices del icosaedro de las PDC (figura obtenida de Jayaram y col., 2004).

Cubierta externa de la cápside del rotavirus

La capa mas externa del rotavirus la componen dos proteínas estructurales, VP4 (~88 kD) y VP7 (~37 kD) (Prasad y col., 1990). La superficie externa del virus está hecha de 780 copias de la glicoproteína VP7 organizada en trímeros. A su vez, 60 estructuras semejantes a espículas formadas por dímeros de VP4, sobresalen de la superficie del virión. En total cada partícula del rotavirus tiene 120 copias de VP4. La proteína VP4 tiene un rol principal en el proceso de entrada a la célula. VP4 está involucrada no sólo en la unión y penetración a la célula, también en hemaglutinación, neutralización y virulencia (Estes, 2001). VP4 es susceptible a proteólisis, este aspecto constituye un evento clave para la internalización eficiente del rotavirus en la célula. Es importante anotar que la replicación del rotavirus ocurre en los enterocitos, un ambiente rico en proteasas. En ensayos *in vitro*, se ha demostrado que los virus tratados con tripsina entran a las células de manera más fácil y rápida en contraste a los no tripsinizados (Jayaram y col., 2004). El corte proteolítico de VP4, resulta en VP5* (60 kDa) y VP8*(28 kDa). El estudio cristalográfico de rayos X de los dos fragmentos, evidenció que el dominio globular distal de VP4, está compuesto de VP8* y el cuerpo restante de la espícula lo forma VP5* (Dormitzer y col. 2002, 2004). En el proceso de entrada de la partícula viral a la célula blanco, el dominio VP8* está involucrado en la interacción con ácido siálico (Isa y col., 1997), mientras VP5* está implicado en la interacción con integrinas (Coulson y col., 1997; Guerrero y col., 2000; Zarate y col., 2000).

Cubierta intermedia del rotavirus

La cubierta intermedia está formada por la proteína VP6 y está en contacto directo con la cubierta de VP7 (Shaw y col., 1996; Yeager y col., 1994). Las partículas que sólo llevan VP6 en el exterior, son llamadas partículas de doble cubierta o PDC. La proteína VP6 conserva la misma simetría icosaédrica de la proteína de cubierta VP7 (T=13), con 780 copias de VP6 ordenada en 260 trímeros, esto permite a los canales acuosos quedar en una posición coordinada respecto a las dos cubiertas de simetría T=13 (Pesavento y col., 2006).

La PDC es la forma transcripcionalmente activa del virus durante el ciclo replicativo. VP6 es la proteína principal, en masa, de la partícula de rotavirus. Esta juega un rol primordial en la organización de la arquitectura del rotavirus, ya sea, al interactuar con las proteínas más externas, VP7 y VP4, y la cubierta mas interna, VP2. Así, esta proteína puede integrar dos funciones principales del virus: entrada a la célula (capa externa) y transcripción endógena (cubierta interna). Los estudios de cristalografía por rayos X de la proteína VP6 han mostrado que tiene dos dominios (Mathieu y col., 2001). El dominio distal, hace contacto con la proteína de cubierta VP7 y el dominio inferior, consiste en un grupo de α -hélices, las cuales hacen contacto con la capa interna VP2. También en su estructura total, VP6 es similar a la proteína VP7 de BTV (Grimes y col., 1997; 1998) y a la proteína μ 1 de orthoreovirus (Liemann y col., 2002).

En los virus de dsRNA aún no se conocen en su totalidad los eventos de la transcripción endógena, sin embargo en estos virus la arquitectura de la cápside y la

organización del genoma se coordinan de tal manera que aseguran múltiples “rounds” de transcripción (Jayaram y col., 2004).

Cubierta VP2 y el complejo enzimático transcripcional

Debajo de la cubierta de VP6 está la capa de proteína mas interna de la estructura de rotavirus. A este nivel es llamada como partícula de simple cubierta (PSC). La PSC cubre el genoma del rotavirus, dentro de una capa de proteína compuesta por VP2, ordenada en 60 dímeros y con simetría icosaédrica T=1 (Lawton y col., 1997a). Los miembros de la familia *Reoviridae* estructuralmente caracterizados, al igual que otros virus de dsRNA como phi6 y el virus L-A, muestran esta organización única de la proteína del *core* (Prasad y Prevelige., 2003).

En contraste a todas las proteínas estructurales de rotavirus, VP2 al ser expresada individualmente en el sistema de baculovirus, tiene la habilidad de formar una cápside icosaédrica semejante a la nativa (Labbe y col., 1991). Además, la co-expresión de VP2 en células de insecto con otras proteínas estructurales, resulta en la formación de partículas semejante a virus, con una organización de la cápside idéntica a los viriones nativos (Prasad y col., 1996). Esto hizo pensar en la probabilidad de que VP2, esté dirigiendo el ensamblaje correcto del virión.

Las dos proteínas estructurales restantes son VP1, la polimerasa viral (Valenzuela y col., 1991) y VP3 la guanilil metiltransferasa (Liu y col., 1992; Chen y col., 1999). Ambas proteínas aunque se encuentran en una cantidad menor en el virión, son esenciales en la transcripción endógena y posterior “capping” de los transcritos.

Basados en estudios de criomicroscopía electrónica es probable que VP1 y la proteína VP3 estén posicionadas en los 12 vértices del *core* (Prasad y col., 1996). Se sabe además que 92 residuos del N-terminal de VP2, son esenciales en la interacción de VP1 y VP3 (Lawton y col., 1997b; Zeng y col., 1998).

En resumen VP1, VP2, VP3 y los segmentos del genoma forman el *core* del virión.

1.3 Ciclo infectivo

En la figura 2 se muestra un esquema del ciclo replicativo del rotavirus. El paso inicial de la replicación viral, la interacción de rotavirus con la superficie de la célula hospedera, es un proceso complejo en el cual ocurren diferentes contactos entre los receptores celulares y los dominios, en especial de la proteína de cubierta, VP4 (López y Arias., 2006).

El primer contacto de la partícula del rotavirus con la superficie de la célula es entre el ácido siálico (SA) y el dominio VP8* de la proteína VP4. Esta interacción del virus con SA, induce probablemente un cambio conformacional en VP4, dando lugar a una segunda interacción con la integrina $\alpha 2\beta 1$ y el dominio VP5*. Después de esta segunda interacción, al menos se presentan uno o tres contactos adicionales, los cuales involucran a la proteína de "shock" térmico hsc70, las integrinas $\alpha \nu \beta 3$, $\alpha \nu \beta 2$ con las proteínas VP7 y el dominio VP5*. Aún no se ha establecido si esas tres interacciones ocurren de forma secuencial o aleatoria.

En cuanto al mecanismo de penetración del virus a la célula aún no está completamente dilucidado, pero las interacciones mencionadas, probablemente median la pérdida de la envoltura externa y permiten la iniciación de la transcripción del genoma viral en el citoplasma de la célula (Lawton y col., 2000).

La PDC sintetiza 11 RNAs de polaridad positiva (RNAs +) los cuales tienen "cap" en el extremo 5', pero no cola poly A en el extremo 3' (Benureau y col., 2005; Cohen y col., 1979). La traducción de los 11 RNAs, da origen a seis proteínas estructurales (VP) y seis proteínas no estructurales NSPs (Mitchell y Both, 1990). La interacción de dos proteínas no estructurales, NSP2 y NSP5, tiene como consecuencia la formación de estructuras especializadas, llamadas viroplasmos (Fabbretti y col., 1999). En estos se lleva a cabo la encapsidación y replicación del genoma, además de ser el sitio donde se ensambla el *core* viral. Los *cores* se convierten en PDC al interactuar con la proteína VP6, la cual se encuentra acumulada en la periferia de los viroplasmos. Las PDC pueden amplificar el ciclo replicativo al entrar en una segunda etapa de síntesis de la hebra (+), o pueden adquirir la proteína de cubierta al interactuar en el retículo endoplasmático (RE) con VP4 y VP7 (González y col., 2000). La afinidad de VP6 por la porción citosólica de la proteína viral de membrana del RE, NSP4, implica el movimiento de las PDC hacia el RE (Taylor y col., 1996). La proteína NSP4 forma complejos con VP7 en la membrana del RE para formar partículas de triple cubierta (TLP), pero se desconoce en que etapa la partícula viral adquiere la proteína VP4. En la fase transitoria por el RE, se ha detectado una membrana alrededor de las PDCs, la cual se pierde cuando se adquiere VP7 (Petrie y col., 1982). El ciclo infeccioso de rotavirus finaliza, cuando se produce la lisis de la célula hospedera y la partícula viral es liberada.

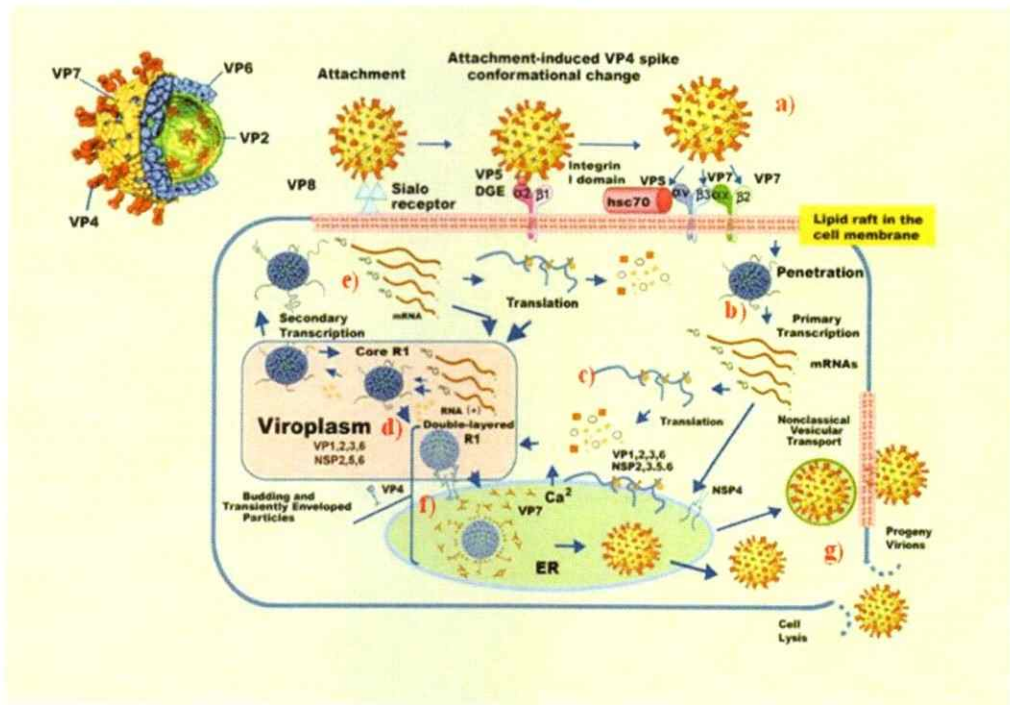


Figura 2. Ciclo viral del rotavirus.

Figura 2. Ciclo viral del rotavirus. a) La entrada de la partícula viral implica la interacción de las proteínas de cubierta VP4 y VP7 con receptores celulares de la célula huésped (ácido siálico, integrinas y la proteína hsc70). b) Proceso de transcripción. Una vez dentro de la célula, el virión pierde la cubierta externa e inicia la transcripción. c) Síntesis de polipéptidos virales. d) Síntesis de dsRNA genómico y armado de las partículas de doble cubierta, PDC, las cuales pueden ir a una segunda etapa de transcripción e) o producir partículas maduras, al adquirir las proteínas de cubierta VP4 y VP7 (f). Finalización del ciclo infeccioso del rotavirus al producir lisis de la célula hospedera (g). (Figura adaptada y modificada de Estes, 2001; López y Arias, 2004).

2. Proteínas virales involucradas en las primeras etapas de la morfogénesis del rotavirus y de interés en esta tesis

2.1 Proteína estructural VP1:

VP1 corresponde al producto del segmento 1 del genoma viral y se ha identificado como la RNA polimerasa viral dependiente de RNA (RdRP). Esta posee funciones de transcriptasa y replicasa, cataliza la síntesis del mRNA viral y del RNA de doble hebra respectivamente (Zeng y col., 1996). La proteína tiene una masa molecular de 125 kDa y está compuesta por 1088 aminoácidos (Estes, 2001).

Las RdRPs de la familia *Reoviridae*, sintetizan el mRNA mientras están contenidos en partículas subvirales (Lawton y col., 2000). En el caso del rotavirus, para que la partícula viral pueda transcribir, requiere de la cubierta intermedia VP6. Por otro lado, en la síntesis de la hebra negativa del RNA, no requiere este tipo de organización estructural.

La polimerasa por si sola une de forma específica el templado de RNA, pero necesita de la proteína del core, VP2, para la actividad replicasa (Patton, 1996; Patton y col., 1997). Esta actividad parcial al parecer es una característica en algunas de las polimerasas virales de la familia *Reoviridae*. Es así como la polimerasa VP1 de "bluetongue virus" (BTV) purificada, muestra sólo actividad replicasa (Boyce y col., 2004). En la proteína recombinante $\lambda 3$, la RdRP de reovirus, la actividad transcriptasa es limitada, la cual necesita de las proteínas del core (Starnes y Joklik., 1993).

El primer conocimiento de dominios funcionales en la polimerasa del rotavirus, se obtuvo al realizar análisis bioinformáticos, basados en la información disponible de otras replicasas de virus de RNA de hebra simple y de doble hebra (Vásquez-del Carpio y col., 2006b). En una publicación reciente se determinó la estructura atómica de VP1, como apoenzima y además acomplejada con RNAs de hebra simple conteniendo secuencias relevantes (Lu y col., 2008). Los análisis cristalográficos muestran que VP1 es una proteína globular de aproximadamente 70 Å de diámetro. Tiene tres dominios distintivos (figura 3): un dominio N-terminal (1-332 a.a.); el dominio de la polimerasa, en el cual se conserva la estructura clásica de mano derecha encontrada en todas las RdRP y en las DNA polimerasas, con los subdominios denominados dedos, palma y pulgar (333-778 a.a.). Además se encuentra el dominio C-terminal o de "abrazadera" (779-1089 a.a.). Los dominios N y C-terminal encierran al dominio de la polimerasa, creando una estructura en forma de cubo, en donde la región catalítica se localiza dentro de una cavidad central. Es importante anotar que esta organización de VP1, es muy similar a la RdRP de reovirus, $\lambda 3$ (Tao y col., 2002). El dominio de la polimerasa de VP1, incluye seis motivos canónicos (A-F) presentes en las RdRPs (van Dijk y col., 2004). En el subdominio de la palma, se encuentran los motivos A y C, estos incluyen los residuos ácidos conservados del sitio activo (Asp520 y Asp525 del motivo A; Asp631 y Asp632 del motivo C) que en conjunto con 2 iones divalentes, son claves en la formación del enlace fosfodiéster (Joyce y Steitz., 1995).

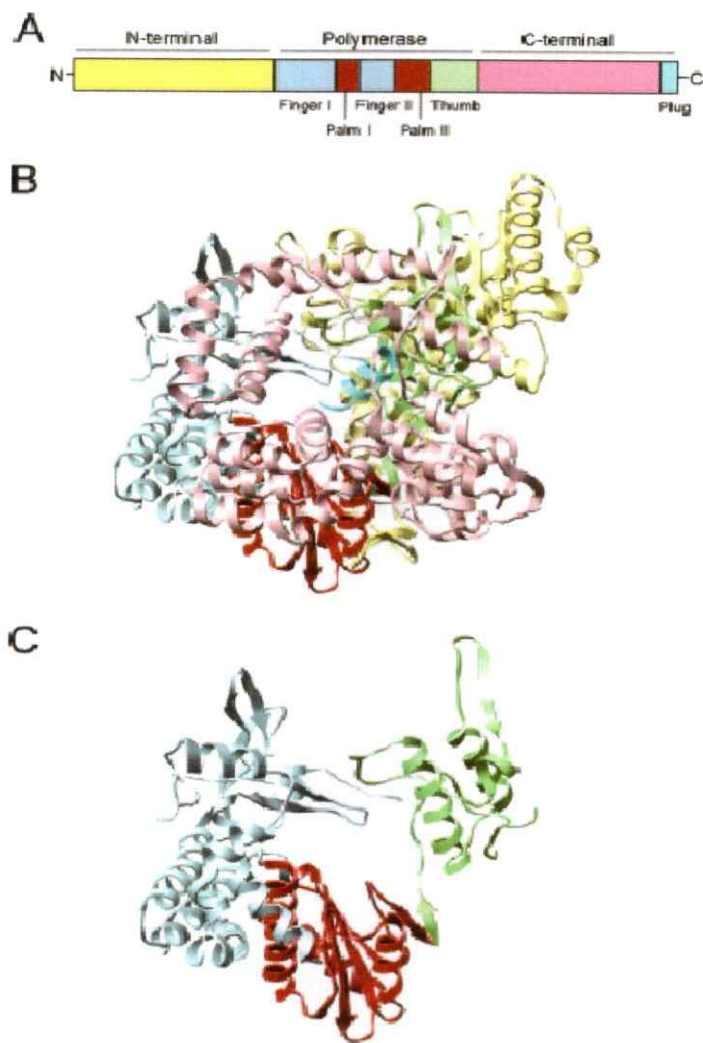


Figura 3. Estructura y organización de la polimerasa del rotavirus, VP1.

Figura 3. Estructura y organización de la polimerasa del rotavirus, VP1. A y B. Esquema que ilustra la organización de los tres dominios de VP1. El dominio N-terminal se muestra en amarillo y el C-terminal en rosado. Los colores designados para los subdominios de la polimerasa son azul claro para los “dedos”, rojo para la “palma” y verde para el “pulgar”. El “tapón” ubicado en el dominio C-terminal se muestra en color cian. C. Dominio de la polimerasa la cual contiene, los subdominios “dedos”, “palma” y “pulgar” (Tomado de Mc Donald y col., 2009).

En las RdRPs virales como la NS5B de hepatitis C (Bressanelli y col., 1999); P2 de bacteriofago $\phi 6$ (Butcher y col., 2001) y la RdRP del virus de la diarrea bovina (Choi y col., 2004), presentan una característica estructural que las distingue de las otras polimerasas como la RT de HIV-1, una DNA polimerasa dependiente de RNA (Kohlstaed y col., 1992; Jacobo-Molina y col., 1993). Esta característica estructural la determina la interconexión de los “dedos” y el “pulgar”, favoreciendo una conformación de “mano cerrada” en las RdRPs opuesta a la de “mano abierta” de las otras polimerasas conocidas (van Dijk y col., 2004). Esta estructura cerrada crea un canal para el templado, el cual podría regular el reconocimiento del sitio de iniciación. Así mismo, el canal del templado y estructuras adicionales aseguran que la iniciación de la síntesis de la hebra negativa de RNA, se realice desde el extremo 3' de los RNAs del HCV y del bacteriofago $\phi 6$.

Esta estructura cerrada también se encontró en la polimerasa VP1. Un análisis más detallado y comparativo con la polimerasa de reovirus, muestra que los elementos estructurales de los “dedos” de VP1, constituyentes de un lado del túnel de entrada del templado (VP1 residuos 395 a 420 y $\lambda 3$ residuos 455 a 491), difieren en su arreglo tridimensional. Se ha sugerido un rol probable de estos segmentos, en el reconocimiento de la secuencia consenso del extremo 3' del templado de RNA. El subdominio del “pulgar” (residuos 686 a 778), presenta una estructura secundaria igual al de $\lambda 3$ en donde una sábana β es seguida por tres hélices α . Un “loop” en la punta o el extremo del “pulgar” de VP1 (residuos 697 a 700), interactúa con la punta de los “dedos”, encerrando el sitio catalítico en la “palma” y crea una restricción en el túnel de entrada del templado.

El contacto “dedos”-“pulgar”, mantiene a VP1 en una conformación cerrada mientras esta inactiva.

Otra característica común encontrada en VP1 y en $\lambda 3$, pero no en otras RdRPs, es una estructura llamada “priming loop”, esta permite la unión del nucleótido de iniciación para la síntesis del RNA. En VP1, el “priming loop” (residuos 489 a 499), se encuentra retraído en VP1 en comparación a $\lambda 3$. Solo el complejo de iniciación del que hacen parte el GTP, Mg^{2+} y VP2 inducen un cambio conformacional en el complejo inactivo VP1-RNA (+), permitiendo la iniciación de la síntesis de la hebra negativa (Shatkin y col., 2008).

También se determinó la estructura de VP1, acomplejada con una serie de segmentos de RNA conteniendo las secuencias consenso del extremo 3' (3'CS: 5'-UGUGACC-3') (Lu y col., 2008). El oligonucleótido de RNA (+), se une al canal de entrada del templado y tiene numerosas interacciones las cuales incluyen una red de puentes de hidrógeno con residuos de VP1, localizadas en su mayoría en el subdominio de los “dedos” y el dominio N-terminal. De manera interesante se encontraron residuos de VP1, manteniendo contactos extensivos con la secuencia conservada UGUG, más allá del sitio activo de la polimerasa, esto al parecer sirve para posicionar el RNA (+) de una manera consistente. Además se halló que el extremo 3' del RNA (+), tiene un nucleótido excedido con respecto al sitio de inicio. En consecuencia el segundo y tercer nucleótido, están enfrente de los sitios N y P respectivamente, lugar donde se inicia la síntesis de la hebra negativa.

El RNA debe hacer un cambio para posicionarse e iniciar la replicación, pero como se mencionó anteriormente, se requiere además de VP1 y el templado de RNA, de VP2, GTP y Mg^{2+} . Experimentos similares se llevaron a cabo con VP1 y segmentos conservados del extremo 3' pero del RNA (-), los resultados mostraron también que hay un nucleótido excedido con respecto al sitio activo, pero los tetranucleótidos conservador AAAA de la estructura 3' de la hebra negativa del RNA, no tienen una red específicas de contactos, en contraste con el patrón de contactos específicos observados con la secuencia consenso del extremo 3' UGUG de la hebra positiva del RNA (Lu y col., 2008).

En el dominio C-terminal o de "abrazadera", también encontrado en $\lambda 3$, forma una especie de "tapón" (conteniendo α -hélices), el cual restringe el ancho del túnel por donde salen la hebra (-) de RNA/dsRNA (figura 3f). Este tapón debe ser sacado cuando la síntesis de RNA tiene lugar en el sitio activo de la polimerasa (Lu y col., 2008; Shatkin y col., 2008).

Proteínas no estructurales NSP2 y NSP5

Proteína NSP2:

NSP2 es una proteína no estructural de 35 kDa codificada por el segmento 8 (gen 8) del rotavirus. Las evidencias que sugieren un rol de NSP2 en la replicación y encapsidación del genoma de rotavirus se mencionan a continuación:

-NSP2 se localiza en los llamados viroplasma, sitios de replicación y ensamblaje de las células infectadas (Petrie y col., 1982; Petrie y col., 1984).

-NSP2 es un componente de los intermediarios de replicación (RIs), los cuales se obtienen de células infectadas y muestran bajo condiciones *in vitro* actividad replicasa (Gallegos y Patton, 1989; Helmberger y Patton, 1986; Patton y Gallegos., 1988).

-NSP2 está asociada físicamente con RNA viral parcialmente replicado (Aponte y col., 1996) y con VP1 (Kattoura y col., 1994).

El primer estudio *in vivo* donde se determinó la importancia de NSP2 en la infección del rotavirus, se llevó a cabo con mutantes termosensibles (*tsE*) en el gen 8 del rotavirus (Chen y col., 1990; Ramig y Petrie, 1984). Cuando las células infectadas con las mutantes *tsE* se mantienen en una temperatura no permisiva, contienen pocos viroplasma, son deficientes en RIs con actividad replicasa y en su mayoría producen partículas virales vacías (deficientes en dsRNA). Esto sugiere un rol de NSP2 en la encapsidación de RNA y la síntesis de la hebra menos.

De igual manera el estudio de la pérdida de función de NSP2 utilizando RNA de interferencia (RNAi), demostró que la expresión de esta proteína es esencial en la replicación *in vivo* del rotavirus (Silvestri y col., 2004). Las células infectadas con rotavirus SA11 y a su vez transfectadas con RNAi, teniendo como blanco RNAs (+) de NSP2, presentaron incapacidad en la formación de viroplasma, síntesis de dsRNA viral y en el ensamblaje de partículas virales.

Al restaurar la función de NSP2 con un sistema de complementación, se revertieron los efectos del RNAi en las células (Taraporewala y col., 2006).

Estos estudios *in vivo* indican que NSP2 tiene un rol crítico en la formación de viroplasmos y en la replicación del rotavirus.

Al obtener NSP2 como proteína recombinante esta es multimérica y se organiza como un octámero. Es una proteína básica que une ssRNA de manera inespecífica y con alta afinidad (Kattoura y col., 1992; Taraporewala y col., 1999). NSP2 muestra poca afinidad por dsRNA. Se sabe también que los multímeros de NSP2 se unen al ssRNA de manera cooperativa, esta propiedad es crítica en la actividad desestabilizadora de RNA de doble hebra identificada en esta proteína (Taraporewala y Patton, 2001). Esta actividad es importante al remover estructuras secundarias en RNAs (+) virales, que impiden su uso como templado para encapsidación y replicación del genoma. A diferencia de la actividad dependiente de ATP de las helicasas típicas, la actividad desestabilizadora de la α -hélice de NSP2 es independiente de Mg^{2+} y ATP. En NSP2 están ausentes los motivos Walker conservados y clásicamente encontrados en las helicasas virales. La actividad desestabilizadora de doble hélice del multímero de NSP2, es más parecida a la proteína de unión a DNA de hebra simple (SSBs) (Taraporewala y col., 2008).

NSP2 tiene actividad RTPasa, puede remover el fosfato γ del extremo 5' de un RNA trifosforilado (Vasquez-Del Carpio y col., 2006a).

Otra actividad reportada en NSP2 es la de nucleotidil trifosfatasa, es capaz de hidrolizar cualquiera de los cuatro rNTPs a rNDPs y fosfatos (Taraporewala y col., 1999).

Acoplada a la actividad NTPasa, está presente además la de NDP-quinasa, en donde el fosfato y liberado al ser hidrolizados los NTPs, se transfiere a un sustrato NDP para regenerar NTPs (Kumar y col., 2007). Por medio de estudios cristalográficos de rayos X de la proteína NSP2, se ha identificado el posible sitio catalítico de hidrólisis de nucleótidos trifosfato, en una zona que contiene una hendidura de 25 Å que separa la proteína en dos dominios. El dominio N-terminal (residuos 1 a 141) y el dominio C-terminal (residuos 151-313). Por lo tanto, cada uno de los cuatro monómeros constituyentes de la mitad del llamado octámero, contiene un sitio de hidrólisis de nucleótido. Mediante mutagénesis sitio dirigida se ha podido confirmar este putativo sitio catalítico (Vásquez-del Carpio y col., 2004). Las propiedades del octámero de NSP2 son similares a la proteína de translocación del RNA del bacteriofago $\phi 6$, P4. La proteína P4 posee actividad NTPasa no específica y posiblemente actividad helicasa (Juuti y col., 1998). Aunque la proteína P4 se ensambla en un hexámero y no en octámero, la incubación con NTPs induce un cambio conformacional en el hexámero de P4, semejante al efecto que tienen los NTPs en la conformación del octamero de NSP2 (Juuti y col., 1998; Schuck y col., 2001). La superficie del octámero tiene aminoácidos que confieren un ambiente de cargas positivas, lo cual facilitaría la interacción con el RNA. A diferencia de otras proteínas que unen ácidos nucleicos y que poseen una estructura similar, el centro del octámero es hidrofóbico.

Esto sugiere que el octámero se comporta como un motor molecular, en el cual el RNA estaría enrollado igual a un nucleosoma por la parte externa del octámero y que la movilidad del RNA estaría condicionada por los cambios transitorios en la estructura del monómero al hidrolizar los rNTPs.

Proteína NSP5:

Es una proteína de 198 a.a., dimérica, rica en residuos de serina y treonina, tiene afinidad inespecífica por RNA de hebra simple y dsRNA (Vende y col., 2002). Mediante ensayos *in vitro* se ha determinado que NSP5 posee actividad ATPasa y de auto proteína quinasa (Bar-Magen y col., 2007; Poncet y col., 1997; Vásquez-Del Carpio y col., 2004). En células infectadas, la proteína es glicosilada y fosforilada (Afrikanova y col., 1996; González y Burrone, 1991). Los isómeros fosforilados de NSP5, observados *in vivo*, varían de una forma hipofosforilada de 28 kDa, a formas hiperfosforiladas entre 32 y 34 kDa (Afrikanova y col., 1998). Existe controversia acerca de cómo se lleva a cabo la hiperfosforilación de NSP5, mientras unos estudios involucran las quinasas celulares, CKI y CKII (Campagna y col., 2007; Eichwald y col., 2002; Eichwald y col., 2004a), otras investigaciones refutan estos resultados al no encontrar evidencia de la participación de quinasas o de la proteína NSP2 en la hiperfosforilación de NSP5 (Sen y col., 2006). Aún así, los autores proclives a la participación de quinasas celulares en la hiperfosforilación de NSP5, proponen un modelo donde una interacción inicial de NSP2 con NSP5, produce un cambio conformacional en NSP5, quedando expuestos a las quinasas celulares los residuos claves en la hiperfosforilación (Campagna y col., 2007; Eichwald y col., 2004a).

En ensayos *in vivo* se ha observado que NSP5 también interactúa con VP2 y VP1 (Afrikanova y col., 1998; Berois y col., 2003; Gonzalez y col., 1998). Experimentos de co-inmunoprecipitación han mostrado también, la interacción de NSP5 con las proteínas VP1 y NSP2 (Arnoldi y col., 2007).

Se sabe que la interacción de NSP2 con NSP5 en células infectadas, origina los llamados viroplasmos, incluso la co-expresión de estas dos proteínas en células no infectadas, resulta en la formación de inclusiones citoplasmáticas muy semejantes a viroplasmos (Eichwald y col., 2004b; Mohan y col., 2004; Petrie y col., 1984). Hasta el momento se desconoce la función exacta que tiene NSP5 en el ciclo viral, pero su co-localización en los viroplasmos y el estar presente en los RIs junto a proteínas involucradas en la replicación del genoma viral, hace pensar en un rol importante de esta proteína en la morfogénesis del rotavirus.

2.2. Introducción a la Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

La invención del microscopio de fuerza atómica la llevaron a cabo Binnig, Quate y Gerber en 1986, a partir del desarrollo de la microscopía de efecto túnel. En la figura 4 se detallan los elementos principales de un microscopio de fuerza atómica. Este instrumento es capaz de formar una imagen de alta resolución, a partir de la interacción entre una sonda de barrido ("tip"), unida a un brazo flexible ("cantilever"), y una superficie, que tiene lugar cuando el "tip" rastrea la muestra (Bustamante y Rivetti, 1996). La muestra se coloca en un escáner piezoeléctrico, el cual asegura un posicionamiento de alta resolución en las tres dimensiones (Dufrêne, 2003).

La interacción de la muestra con el "tip" causa la deflexión del "cantilever" durante el rastreo y lleva al registro de la topografía y morfología de la muestra con alta resolución espacial. La magnitud de la deflexión es captada por medio de la posición de un haz de láser, enfocado sobre el extremo libre del "cantilever" y reflejado en un fotodetector de arreglo de diodos (Hansma y Hoh, 1994).

En AFM se puede trabajar con tres modos de operación: contacto, no contacto y "tapping" o contacto intermitente (Bustamante y Rivetti, 1996). En el modo contacto, el "tip" se desliza continuamente con un contacto físico permanente sobre la superficie de la muestra, esta operación produce imágenes estables y de muy alta resolución, pero las fuerzas generadas entre el "tip" y la superficie podrían dañar la muestra cuando ésta es considerablemente más blanda que el "tip".

En contraste, cuando se trabaja con el modo "tapping", el "cantilever" oscila verticalmente a cientos de kilohertzios y por consiguiente el "tip" tiene un contacto transitorio con la muestra (Bustamante y Rivetti, 1996). Debido a que el contacto es muy breve, la probabilidad de dañar o modificar la muestra se reduce, por este motivo el modo "tapping" es preferido para aplicaciones biológicas. Además se pueden obtener imágenes de fase al tiempo que se adquieren imágenes topográficas por el modo "tapping".

En este modo, las diferencias de la amplitud de la oscilación del "tip" al rastrear la superficie versus cuando está oscilando libremente al aire, constituyen las diferencias de altura y por consiguiente la topografía de la muestra. Además de la diferencia de amplitud se puede registrar simultáneamente diferencias en la fase de la oscilación

del "tip", provocada por zonas de la superficie con diferentes propiedades físico-químicas; composición, dureza, adhesión, fricción, o viscoelasticidad, etc.

En AFM el primer análisis se basa en estudiar la forma y el tamaño de las moléculas.

La medición analítica mas utilizada en AFM es la determinación de la dimensión vertical o altura, no obstante los valores de altura de las proteínas o ácidos nucleicos aparecen menores a sus valores reales (Bustamante y Rivetti, 1996). Hay múltiples causas para esta situación, las cuales incluyen desnaturalización de las moléculas al unirse a la superficie de la mica, deformación de la muestra debido a la fuerza ejercida por el "tip", propiedades mecánicas del objeto y propiedades electrostáticas locales (Bustamante y Rivetti, 1996; Heymann y col., 2002).

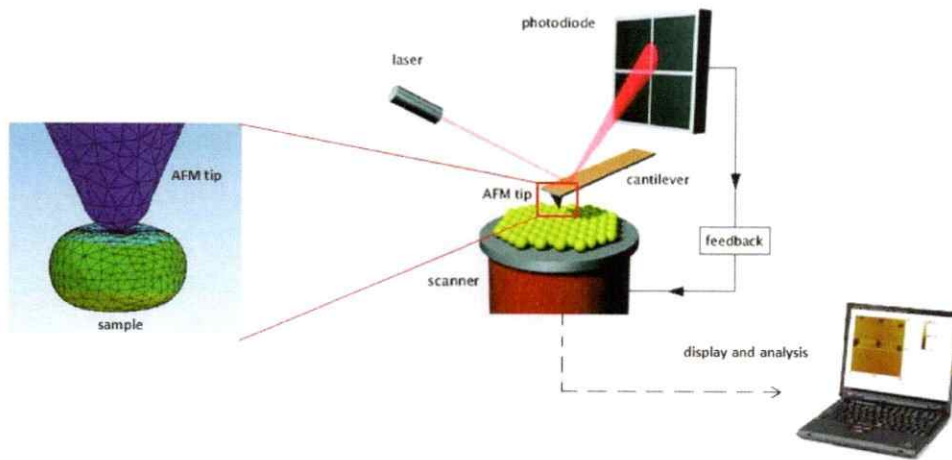


Figura 4. Elementos principales de un Microscopio de Fuerza Atómica.

(Adaptado de Jalili y Laxminarayana, 2004; Kasas y Dietler, 2008).

2.3. Antecedentes del trabajo

El genoma del rotavirus contiene toda la información para su multiplicación en la célula y para dirigir la síntesis de sus componentes estructurales. La encapsidación del genoma dentro de cápsides virales, lo protege de la degradación por nucleasas dentro de la célula hospedera, como también fuera de esta (Kainov y col., 2006).

Existen dos estrategias principales para la encapsidación del genoma de los virus:

- a. El ensamblaje de la cápside alrededor del ácido nucleico viral, es el caso del virus del mosaico del tabaco (TMV) (Buck, 1999).
- b. El ácido nucleico previamente sintetizado o que está siendo sintetizado durante la encapsidación, es introducido en cápsides preformadas. Algunos ejemplos de este tipo de encapsidación incluyen los bacteriófagos ϕ 29, P22, y T4, además de herpesvirus y adenovirus (Kainov y col., 2006).

Aunque se conocen aspectos relacionados con la replicación del rotavirus, la etapa de cómo se seleccionan los 11 RNAs (+) para el ensamble y replicación en los RIs, es aún un misterio. Se sabe que la RdRP del rotavirus, VP1, tiene la capacidad de unirse de manera específica a la secuencia consenso del extremo 3' del RNA (+) (3'CS: 5'-UGUGACC-3') (Patton, 1996). La publicación reciente de la estructura cristalográfica de VP1 (Lu y col., 2008), muestra la importancia de la 3'CS de los RNAs (+). Al parecer este sitio de unión específica, direcciona y coordina la encapsidación del RNA (+) y la replicación del genoma (Shatkin y col., 2008).

La unión de VP1 con el RNA templado, resulta en un RI inactivo enzimáticamente y susceptible a nucleasas.

Estos son convertidos en *precores* o *cores* activos al unirse VP2. Esta proteína promueve cambios conformacionales, resultando en un realineamiento del templado de RNA (+) en el sitio catalítico y la consecuente iniciación de la síntesis de la hebra (-) (Lu y col., 2008; Patton y col., 1997). Además de las señales de reconocimiento encontradas en la secuencia consenso (CS) del extremo 3' del RNA, VP1 reconoce secuencias no conservadas y previas al extremo 3' (Tortorici y col., 2003). Aunque los ensayos de replicación utilizando templados de RNA con mutaciones en la 3'CS, demuestran su importancia en la síntesis del dsRNA (Chen y col., 1994; Patton y col., 1996;1997), no siempre las señales de reconocimiento presentes en los RNAs (+), son requeridas en la síntesis del dsRNA genómico. Es el caso de las dos citosinas presentes en la 3'CS, estas son críticas en la replicación pero no forman parte de la señal de reconocimiento por la polimerasa viral (Chen y col., 1994; Tortorici y col., 2003). Los complejos cristalográficos de VP1 con oligonucleótidos de RNA (+), confirma que las bases UGUG de la 3'CS, forman puentes de hidrógeno con residuos de VP1, quedando las dos citosinas alejadas levemente del sitio de iniciación y sólo la presencia de VP2 ayuda a posicionarlas en un registro correcto (Lu y col., 2008).

Otras señales en el RNA templado involucradas en la síntesis *in vitro* de dsRNA genómico, incluyen al extremo 5' del RNA y regiones previas al 3'CS (Chen y Patton, 1998; Patton y col., 1996; Tortorici y col., 2006).

Por otro lado al realizar mutaciones truncando regiones pertenecientes al marco abierto de lectura (ORF) en los templados de RNA, se demostró que estos eran replicados de manera ineficiente (Patton y col., 1999).

Se cree que estas regiones dentro de los ORFs son importantes para la replicación, porque contribuyen al plegamiento intramolecular del RNA templado.

Aunque los RNAs templados del rotavirus conservan la 3'CS y se asocian con las mismas proteínas en los RI, se espera que dadas las diferencias en la secuencia total y en longitud resulte en plegamientos estructurales particulares para cada RNA.

De manera interesante, los resultados de la estructura secundaria de algunos de los RNA templados indican que los extremos 5' y 3' interactúan entre si para formar estructuras 5'-3' "panhandle" (Patton y Spencer, 2000; Tortorici y col., 2006). Se sugiere que esta estructura en "panhandle" podría estabilizar los RNAs templados al favorecer su ciclización, haciendo mas accesible la polimerasa viral a la región 3'CS (Tortorici y col., 2006). Esta ciclización del RNA se ha observado en el virus del dengue y es importante para la replicación del genoma viral (Alvarez y col., 2005).

Hasta el momento la técnica utilizada para determinar la interacción de la polimerasa del rotavirus con el templado de RNA, han sido los ensayos de retardo de movilidad electroforética (EMSA). Específicamente se han utilizado para los ensayos de EMSA, transcritos cortos de RNA de los genes 8 y 11 del rotavirus obtenidos mediante transcripción *in vitro* (Tortorici y col., 2003), pero no la molécula completa del RNA templado.

Se desconoce si el RNA templado tiene alguna conformación o plegamiento especial al interactuar con VP1 o con las proteínas no estructurales, NSP5 y NSP2, involucradas en encapsidación y replicación del genoma viral.

En relación a lo que conocemos para otros virus con dsRNA, varios puntos en común tienen los *Cystoviridae* y *Reoviridae* en los procesos de encapsidación y replicación. En ambas familias de virus hay coincidencias como, la presencia de secuencias conservadas en los extremos 5' y 3' del RNA templado, las cuales son importantes para la encapsidación y replicación (Chen y Patton, 1998; Frilander y col., 1992; Gottlieb y col., 1994); la existencia de precursores del *core* (*precores*) conteniendo la RdRP (Patton, 2001; Kainov y col., 2003) y también encontramos una NTPasa asistiendo el proceso de replicación (NSP2 en rotavirus, NS2 en BTV, sNS en reovirus y P4 en $\phi 6$) (Jayaram y col., 2002; Kainov y col., 2003; Schuck y col., 2001; Taraporewala y col., 1999). En contraste a la proteína NSP2 del rotavirus, la proteína NS2 de BTV une de manera específica los transcritos de RNA del BTV (Lymeropoulos y col., 2003; 2006), pero está involucrada al igual que NSP2, en la formación de estructuras semejantes a viroplasmos en células infectadas por BTV (Roy, 2005). La proteína no estructural del reovirus δ NS, también tiene características similares a NS2 y NSP2 como son la unión a ssRNA, habilidad para formar homomultímeros que unen ssRNA y la acumulación en inclusiones citoplasmáticas de células infectadas (Taraporewala y col., 2001).

Lo descrito anteriormente converge en que la mayoría de los miembros de la familia *Reoviridae*, dependen de proteínas no estructurales y de la formación de inclusiones citoplasmáticas, para el proceso de encapsidación y replicación del genoma viral (Patton y Spencer, 2000).

Los estudios tanto *in vivo* como *in vitro*, dan cuenta de la importancia de las proteínas no estructurales NSP2 y NSP5 en la encapsidación y replicación del genoma del rotavirus (Aponte y col., 1996; Campagna y col., 2005; Gallegos y Patton, 1989; Silvestri y col., 2004).

Los análisis cristalográficos de la proteína NSP2 demuestran que la formación del octámero, es producto de la interacción de dos tetrámeros de NSP2 (Jayaram y col., 2002), en donde cuatro hendiduras altamente básicas, se extienden en la superficie del octámero. Adicionalmente investigaciones de criomicroscopía electrónica han demostrado que estas regiones básicas presentes en las hendiduras del octámero, son el sitio de unión del RNA de hebra simple (ssRNA) y de la proteína NSP5 (Jiang y col., 2006). Se sabe que tanto NSP2 como NSP5 interactúan con VP1 (Afrikanova y col., 1998; Arnoldi y col., 2007; Kattoura y col., 1994). Además estas proteínas co-localizan en los viroplasmos y son los constituyentes principales de los intermediarios de replicación (Taraporewala y Patton, 2004).

Por todo lo anterior es posible afirmar, que en los primeros eventos de la morfogénesis viral hay un reconocimiento de la polimerasa viral hacia el mRNA templado y posterior a esto una interacción de las proteínas NSP2 y NSP5 con VP1.

Teniendo en cuenta que en las primeras etapas de la morfogénesis del rotavirus, ocurren interacciones entre el RNA templado y proteínas presentes en los intermediarios de replicación, decidimos utilizar la técnica de AFM para estudiar estos complejos (Binnig y col., 1986).

Esto en gran medida por las ventajas del AFM como son: uso de moléculas de ácidos nucleicos de longitud mayor a la empleada en otras técnicas, se puede observar la conformación adoptada por las moléculas de RNA y si las proteínas se están uniendo a un sitio específico de los ácidos nucleicos (Bustamante y Rivetti, 1996; Hansma y col., 1996).

HIPÓTESIS

En los primeros eventos de la morfogénesis del rotavirus, la polimerasa VP1 reconoce el templado de RNA y las proteínas NSP2 y NSP5 interactúan posteriormente con el complejo de RNA y VP1. La interacción de VP1 con las proteínas NSP2 y/o NSP5 puede estar ocurriendo en el mismo sitio del RNA donde se une VP1.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar los complejos individuales formados con la polimerasa VP1, NSP2, NSP5 y el templado de RNA.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar si la unión de VP1 al RNA templado depende de una secuencia en particular.
2. Estudiar complejos individuales de NSP2 y NSP5
3. Estudiar la interacción de NSP2 y NSP5 con el RNA templado.

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Cultivo Celular

Células de insecto

Sf-9 es una línea celular estable procedente del ovario de oruga de la acelga (*Spodoptera frugiperda*). Para el cultivo de Sf-9 se utilizó el medio SF900 II SFM (Invitrogen).

High Five (Hi5) es una línea celular estable procedente de una línea parental embrionaria de Gusano falso medidor (*Trichoplusia ni*). Para cultivar las células Hi5 se usó el medio Express Five SFM (Invitrogen) con 18 mM de L-glutamina (Sigma).

Ambas líneas celulares de insecto se adquirieron de Invitrogen.

Las líneas celulares de insecto crecidas en monocapas o en cultivos en suspensión, se mantuvieron a una temperatura de 28⁰ C y en un ambiente libre de CO₂.

4.2. Construcción del baculovirus recombinante rBV-VP1

La proteína VP1 es obtenida de un baculovirus recombinante, construido a partir del sistema "Bac-to-Bac" de Invitrogen (figura 5). Este sistema utiliza un vector intermediario el pFastBac, el cual contiene el transposón bacteriano Tn7, que permite la inserción de la secuencia clonada dentro de un bacmidio, al transformar con el DNA donador las células de *Escherichia coli* DH10Bac. El bacmidio recombinado en DH10Bac se utiliza para desarrollar el baculovirus que expresa la proteína de interés.

En primer lugar el gen 1 de Rotavirus (SA11), se clonó en el vector pFastBac Hta entre los sitios *Sall* y *HindIII* según lo descrito por Vasquez-Del Carpio y col., 2006. El correcto clonamiento se verificó mediante PCR, enzimas de restricción y secuenciamiento (Vasquez-Del Carpio y col., 2006b). Se procedió a transformar bacterias competentes de *Escherichia coli* DH10 Bac (100 ul) con el vector conteniendo el gen de interés (1-10 ng). La mezcla de transformación se incubó por 30 minutos en hielo, seguidamente se realizó un choque térmico a 42°C y nuevamente se depositó en hielo por 2 minutos. Se añadieron 400 ul de medio SOC y se procedió a incubar por 1 hora a 37°C con agitación moderada. Posteriormente se diluyó la mezcla de transformación (10^{-1} a 10^{-4}) y se sembró en placas de agar LB suplementadas con Kanamicina (50 ug/ml), Tetraciclina (10 ug/ml), Gentamicina (7 ug/ml), X-Gal (100 ug/ml) e IPTG (40 ug/ml). Las placas se incubaron por 48 horas a 37°C. De los clones positivos se extrajo el bacmidio, el cual se transfectó en células de insecto de *Spodoptera frugiperda* (Sf-9) con liposomas (Cellfectin, Invitrogen). La expresión de la proteína VP1 por los baculovirus recombinantes se verificó mediante "Western Blot", utilizando un anticuerpo primario anti-VP1. Los baculovirus recombinantes expresando VP1 (rBV-VP1) se titularon y guardaron a 4°C protegidos de la luz.

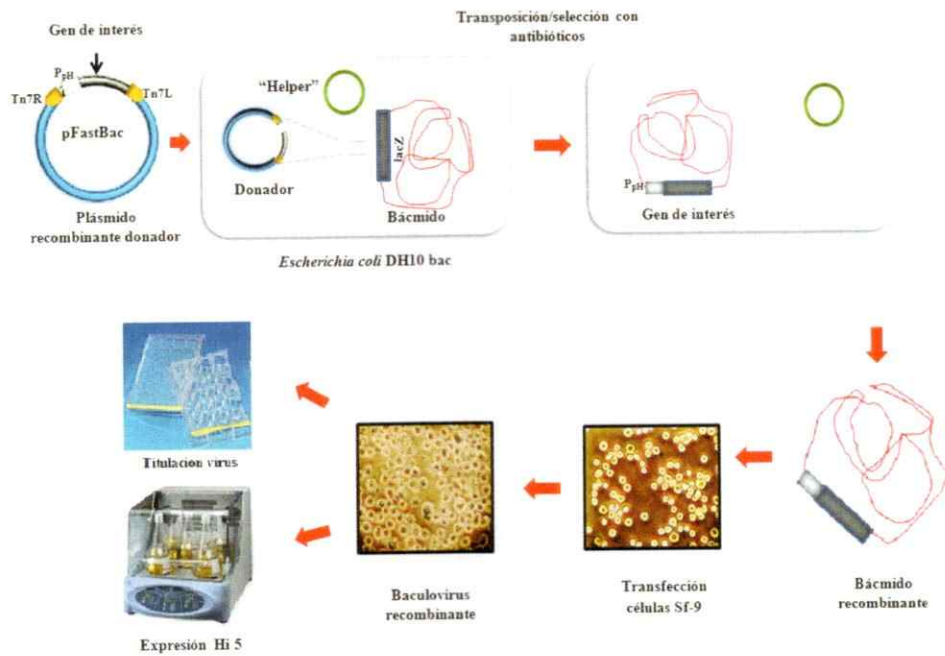


Figura 5. Esquema del sistema de expresión “Bac-to-Bac” de Invitrogen, life Technologies. La figura muestra la construcción de un baculovirus recombinante y la expresión del gen de interés, al utilizar el sistema de expresión de baculovirus “Bac-to-Bac” (figura adaptada del Manual “Bac-to-Bac Baculovirus Expresión System”, Invitrogen).

4.3. Expresión y purificación de la proteína recombinante VP1

Los "stocks" conteniendo el baculovirus recombinante, se emplearon para infectar células de insecto High Five (Hi 5) adaptadas a cultivos en suspensión. Las células Hi 5 se crecieron en el medio Express Five SFM (Invitrogen) hasta alcanzar una concentración de 2×10^6 células/ml, se infectaron a una multiplicidad de infección (MOI) de 1 con el baculovirus recombinante rBV-VP1, se incubaron protegidas de la luz por 72 horas a 28° C y una agitación permanente de 200 rpm. Transcurrido el tiempo de incubación, las células se recogieron mediante centrifugación y se lavaron con un tampón fosfato salino (PBS). La proteína VP1 se purificó a partir de la fracción soluble del lisado de las células de insecto de Hi 5, mediante cromatografía de afinidad usando una resina de agarosa unida a níquel-ácido nitrilotriacético (Ni^{2+} -NTA) y de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (Qiagen). Los eluidos de la purificación, se visualizaron en geles de acrilamida/bis acrilamida-SDS al 8% teñidos con azul de Coomassie y/o nitrato de plata. La presencia de VP1 se confirmó mediante "Western blot". Después de separar las proteínas por SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Biorad) en tampón de transferencia (Tris pH 8.0 25 mM, glicina 150 mM y metanol 10%). La transferencia se llevó a cabo durante 1 hora a 100 voltios utilizando el sistema Miniprotean III (Biorad). La membrana se bloqueó con leche descremada al 5% en tampón TBST (Tris pH 8,0 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,05%). La inmunodetección se realizó con un anticuerpo policlonal de cerdo de guinea anti-VP1 diluido 1:10.000 y un anticuerpo secundario anti cerdo de guinea acoplado a peroxidasa (diluido a 1×10^5).

Confirmada la presencia de la proteína VP1 en los eluidos, se procedió a dializar durante toda la noche en un “buffer” conteniendo: Tris-HCl pH 8,0 100 mM, NaCl 150 mM y DTT 5 mM. Finalmente la proteína se cuantificó mediante el método de Bradford y se conservó a 4⁰ C.

4.3. Expresión y purificación de las proteínas NSP2 y NSP5:

La bacteria M15 [pREP4] la cual contiene el vector pQE60-NSP2 *wt*, se creció en el medio de cultivo Terrific a 37⁰ C hasta alcanzar una D.O._{600nm} de 0,5. La expresión de la proteína se indujo adicionando IPTG al medio de cultivo a una concentración final de 1 mM. Transcurridas cuatro o cinco horas de la inducción, se centrifugó el cultivo bacteriano a 10.000 x *g* durante 30 minutos a 4⁰ C. La proteína se purificó bajo condiciones nativas a partir del lisado bacteriano y mediante cromatografía de afinidad, usando una resina de agarosa unida a níquel-ácido nitrilotriacético (Ni²⁺-NTA, Qiagen) y según lo reportado por Vasquez-Del Carpio y col., 2004. La proteína se dializó en “buffer” LSB (Tris-HCl pH 7,5 2 mM; EDTA 0,5 mM; DTT 0,5 mM y NaCl 50 mM) durante toda la noche a 4⁰C.

La proteína NSP5 se obtuvo a partir de un baculovirus recombinante. La etapa de construcción del baculovirus recombinante expresando NSP5, se realizó de manera similar a lo descrito para la construcción del rBV-VP1. En el vector pFastBac1 (plásmido donador), se clonó la secuencia codificante para la proteína NSP5 (gen 11 del rotavirus). Este clonamiento y su verificación mediante secuenciamiento, lo realizó la empresa GenScript.

· La expresión de NSP5 a partir del baculovirus recombinante se comprobó mediante “Western blot” utilizando un anticuerpo monoclonal anti-His (Sigma) y/o un anticuerpo policlonal anti-NSP5.

· Los “stocks” de baculovirus recombinantes expresando NSP5 (rBV-NSP5) se titularon y guardaron a 4⁰ C protegidos de la luz.

· El baculovirus rBV-NSP5 se usó para infectar células de insecto Hi 5 a una MOI de 1. Después de 72 horas las células se recogieron por centrifugación, se lavaron con PBS, se resuspendieron en “buffer” de lisis (50mM NaH₂PO₄ pH 8,0; 400mM NaCl; 15mM Imidazol; 0,5% Tritón X-100; 1 µg/ml Leupeptina; inhibidor de proteasas libre de EDTA 1X, Roche) y se incubaron en hielo por 30 minutos. Pasado este tiempo, el lisado se centrifugó a 10.000 x g durante 30 minutos a 4⁰ C.

· A partir del lisado clarificado la purificación de la proteína NSP5 se realizó bajo condiciones no denaturantes y de manera similar a lo reportado por Bar Magen y col., 2007. La diálisis de la proteína NSP5 se llevó a cabo en dos etapas, la primera en un “buffer” conteniendo NaH₂PO₄ 50 mM pH 8,0; NaCl 300 mM durante 2 horas a 4⁰C. La segunda diálisis se hizo durante toda la noche a 4⁰ C en “buffer” LSB con una concentración de NaCl de 75 mM y Tritón X-100 0,1%. Los eluidos de la purificación se analizaron en geles SDS-PAGE al 12% y se visualizaron por tinción con nitrato de plata. La detección de NSP5 se hizo por “Western blot”, usando un anticuerpo monoclonal de ratón anti-His (Sigma) diluido 1:1000 y un anticuerpo secundario anti ratón acoplado a peroxidasa (1:10.000).

La cuantificación de las proteínas NSP2 y NSP5 se realizó mediante el método de Bradford.

4.4. Preparación de los templados para transcripción *in vitro*:

El vector pBluescript II KS (Stratagene), en el cual se clonó la secuencia completa del gen 8 del rotavirus (1.058 pb) se linealizó con la enzima *SacII* y luego se trató con la enzima Klenow antes de la transcripción *in vitro* con la polimerasa T3.

Para obtener un transcrito de RNA del gen 8 truncado en la secuencia consenso del extremo 5' ($\Delta 5'$ CS), se clonó en el vector pBluescript parte de la secuencia del gen 8 del rotavirus correspondiente a las 205 pares de bases del extremo 3'. En este caso también se linealizó el vector con la enzima *Sac II*. Para obtener un transcrito de RNA del gen 8 truncado en la secuencia consenso del extremo 3' ($\Delta 3'$ CS), se utilizó la enzima *NsiI* para digerir el vector pBluescript conteniendo el gen 8 completo.

Posterior a la linealización de los vectores mencionados, se hizo un tratamiento al DNA con SDS (20%) y proteinasa K (0,5 mg/ml) durante 30 minutos a 37°C. La mezcla se extrajo con un volumen de fenol: cloroformo, se centrifugó a 10.000 x g por 15 minutos. La fase acuosa se precipitó con 2,5 volúmenes de etanol y 1/10 de acetato de sodio 3 M pH 5,2, se centrifugó a 10.000 x g durante 15 minutos a 4° C, se hizo un lavado con etanol al 70% y nuevamente se centrifugó durante 10 minutos. Finalmente el "pellet" de DNA se resuspendió en agua libre de nucleasas.

Para la transcripción *in vitro* se utilizó entre 0,5 a 1 ug de DNA templado, la reacción se llevó a cabo con el kit RiboMAX™ Large Scale RNA Production System- T3 (Promega) según las indicaciones del proveedor.

Los RNAs producidos en la mezcla de reacción se trataron con DNasa RQ1 (Promega), se precipitaron con cloruro de litio, se lavaron con etanol al 70% y resuspendieron en agua libre de nucleasas. La calidad de los RNAs se evaluó en geles de agarosa-formaldehído al 1% teñidos con bromuro de etidio. La concentración de RNA se calculó espectrofotométricamente (Eppendorf BioPhotometer).

4.5. Preparación de las muestras para AFM

El substrato apropiado para depositar o fijar con éxito un rango amplio de biomoléculas ha sido la mica (Bustamante y Rivetti, 1996; Hansma y Hoh, 1994). La mica muscovita, $KAl_2(OH)_2AlSi_3O_{10}$, es un mineral no conductor, compuesto de capas múltiples y delgadas de 1 nm. La acción de retirar esta cubierta, ocasiona que la superficie de la mica sea negativa al quedar expuestas moléculas de oxígeno. Para mejorar las condiciones de deposición de ácidos nucleicos y revertir la carga de la superficie de la mica se utilizó un "buffer" de deposición con $MgCl_2$ a concentraciones de 5-10 mM (Bustamante and Rivetti, 1996; Hansma y col. 2003).

En las mezclas de reacción se utilizaron las siguientes concentraciones finales de ssRNA y/o proteínas: transcrito de gen 8 completo 0,4 pmoles y proteína VP1 0,12 pmoles; ssRNA truncado en 5' 1,2 pmoles y VP1 0,08 pmoles; ssRNA truncado en 3' 0,3 pmoles y VP1 0,06 pmoles. Proteínas NSP2 y NSP5 2 pmoles y 0,8 pmoles respectivamente. Proteína NSP2, 0,01 pmoles y ssRNA (transcrito gen 8 completo) 0,82 pmoles.

Proteína NSP5 y ssRNA (transcrito gen 8 completo), 0,5 pmoles y 0,17 pmoles respectivamente. Ensayo NSP2, NSP5 y ssRNA: 1,4 pmoles, 3 pmoles y 0,04 pmoles respectivamente.

Las muestras para AFM (5-15 microlitros) se prepararon en un "buffer" conteniendo, Tris-HCl 2 mM (pH 8,0), NaCl 50 mM, DTT 0,5 mM, se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se mezclaron con un volumen del "buffer" de deposición (Tris-HCl 2 mM pH 8,0 y MgCl₂ 5-10 mM) y se depositaron en la mica. Después de 30 minutos de adsorción en la mica, las muestras se lavaron con agua milliQ pre-tratada con dietilpicrocarbonato (DEPC) y se secaron con un flujo suave de nitrógeno para finalmente ser visualizadas en el AFM.

4.6. Condiciones de medida del Microscopio de Fuerza Atómica (AFM)

En los experimentos de AFM se utilizó un microscopio Multimode, "Nacoscope IIIa" de Digital Instruments, USA. Se empleó el modo de operación de "tapping" o contacto intermitente. Por este modo de operación se aseguró no dañar la muestra. Las imágenes son construidas a partir de la diferencia en la amplitud y la fase de la oscilación del "cantilever" (brazo) al barrer o interaccionar con el material versus cuando este oscila libremente al aire. El "cantilever" utilizado posee una longitud de 125 micras y una frecuencia de resonancia entre 200-400 kHz. Unido al "cantilever" se usó una punta de silicio, la cual interacciona con la muestra. En los ensayos de AFM la muestra se depositó en la superficie de una mica y la visualización se realizó en aire.

RESULTADOS

5.1. Purificación de las proteínas VP1, NSP2 y NSP5

Las proteínas VP1 y NSP5 se obtuvieron a partir de baculovirus recombinantes, expresados en células de insectos *Hi 5* adaptadas a cultivos en suspensión. La purificación de ambas proteínas se facilitó porque poseen una cola de histidina en el N-terminal. En las figuras 5a y 5b se muestran los resultados de la purificación de las proteínas VP1 y NSP5 respectivamente. La detección de la proteína VP1 se hizo mediante “western blot”, utilizando un anticuerpo policlonal anti-VP1 (figura 5a). La presencia de la proteína NSP5 se realizó con un anticuerpo monoclonal anti-His (figura 5b).

La proteína NSP2 se expresó en bacterias utilizando IPTG como inductor en el medio de cultivo. El resultado de la purificación de la proteína NSP2 se observa en la figura 5c. Las proteínas después de dializadas se cuantificaron mediante el método de Bradford, para los ensayos de AFM respectivos, se diluyeron a las concentraciones descritas en Materiales y Métodos.

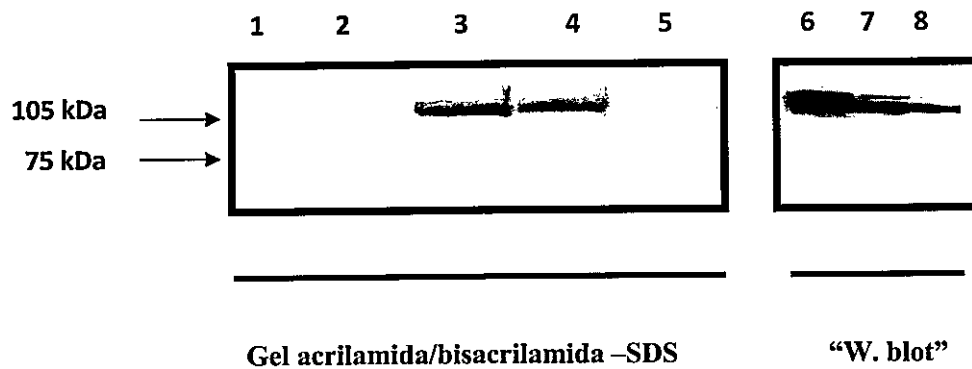


Figura 5a. Expresión y purificación de la proteína VP1. La proteína VP1 se expresó en células de insecto *Hi 5*, infectadas con un baculovirus recombinante rBV-VP1 y la purificación se realizó por cromatografía de afinidad mediante resinas de Ni^{+2} -NTA (Qiagen). En el gel de acrilamida/bisacrilamida-SDS teñido con azul de Coomasie, se muestran eluciones de la purificación correspondientes a la proteína VP1 (carriles 2 al 5). El carril 1 pertenece al marcador de peso molecular de proteínas Full Range RainbowTM (Amersham Biosciences). Los carriles 6 al 8 corresponden al "western blot" para identificar a la proteína VP1, se usó un anticuerpo anti-VP1 (1:10.000).

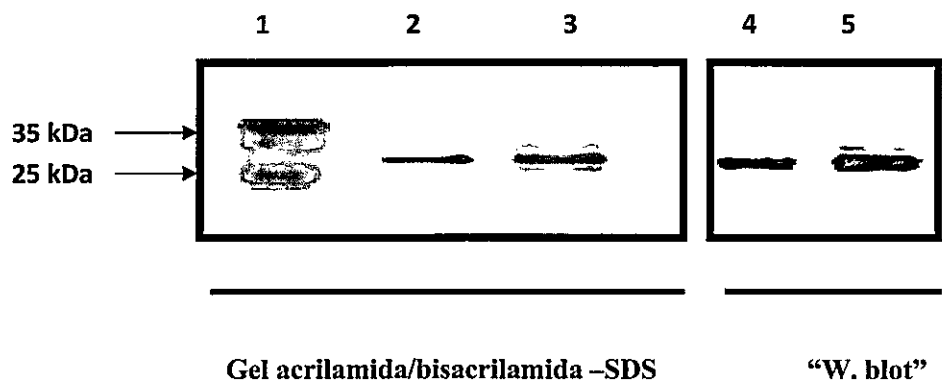


Figura 5b. Expresión y purificación de la proteína NSP5. La proteína NSP5 se obtuvo a partir de un baculovirus recombinante, usado para infectar células de insecto *Hi 5*. La purificación se realizó por cromatografía de afinidad y en el gel de acrilamida/bisacrilamida-SDS teñido con nitrato de plata, se muestran eluciones de la columna de resinas Ni^{+2} -NTA, carriles 2 y 3. Carriles 4 y 5, "western blot" correspondiente a eluciones de la purificación de NSP5, se usó el anticuerpo anti-His. El carril 1 pertenece al estándar de peso molecular preteñido (Winkler).

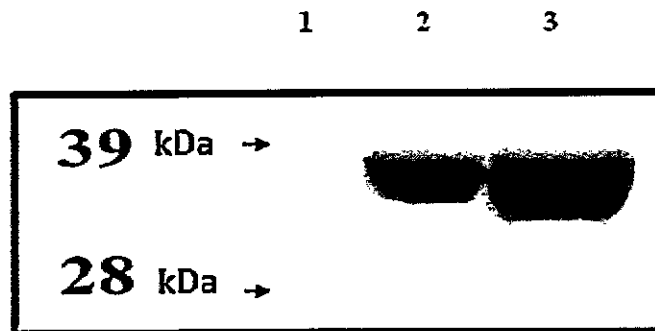


Figura 5c. Expresión y purificación de la proteína NSP2. La proteína NSP2 se expresó en bacterias y la purificación se hizo mediante cromatografía de afinidad, se usó una resina de agarosa unida a níquel-ácido nitrilotriacético (Ni^{2+} -NTA, Qiagen). La imagen corresponde a un gel de acrilamida/bisacrilamida-SDS teñido con azul de Coomassie, en el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular (kDa), los carriles 2 y 3 pertenecen a eluciones de la proteína NSP2 (la proteína NSP2 purificada se obtuvo gracias a la colaboración del Dr. John Patton).

5.2. Obtención de ssRNAs mediante transcripción *in vitro*

Las reacciones de transcripciones *in vitro* se llevaron a cabo con diferentes templados de DNA, una conteniendo la secuencia completa del gen 8 del rotavirus, las dos restantes con el gen 8 truncado en las secuencia consenso del 3' y el 5'. Previo a las reacciones de transcripción los vectores se linealizaron con enzimas de restricción. La integridad de los ssRNA obtenidos en las diferentes transcripciones *in vitro*, para los ensayos de AFM se analizó en geles de formaldehído agarosa al 1%, como se muestra en la figura 6. La cantidad de ssRNA se cuantificó espectrofotométricamente, en promedio para el ssRNA completo del gen 8 (1.058 nucleótidos) y el truncado en el 3' (858 nucleótidos) se obtuvieron 0,7-1,0 ug/ul por reacción. Para el ssRNA corto (205 nucleótidos) las cantidades estuvieron en 0,4 ug/ul por reacción.

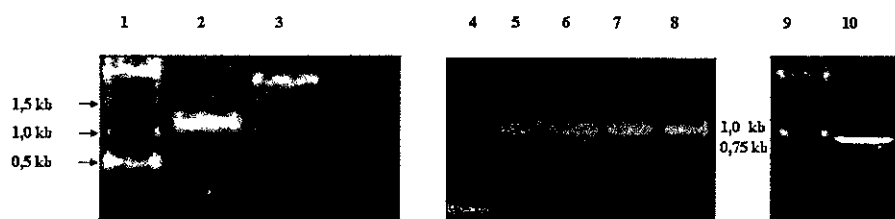


Figura 6a. Productos de transcripción *in vitro* obtenidos por el sistema RiboMAX (Promega). Se muestran geles de agarosa formaldehído (1%) con diferentes transcritos. Los carriles se numeraron del 1 al 10. En donde el carril 1 corresponde al estándar 0,5 al 10 kb RNA Ladder de Invitrogen, se señala el tamaño de las bandas de 0,5, 1,0, y 1,5 kb. Carril 2: transcrito completo del gen 8 del rotavirus (1.058 nucleótidos); carril 3: control de transcripción, mRNA de pTRI-Xef (1,86 kb); carril 4: transcrito del gen 8 truncado en 5' (205 nucleótidos); carriles 5 al 8, transcritos del gen 8 completo del rotavirus. Carril 9: estándar de DNA 1 kb (Winkler), se muestra el tamaño de las bandas de 0,75 y 1,0 kb. Carril 10: transcrito del gen 8 truncado en el 3' (858 nucleótidos).

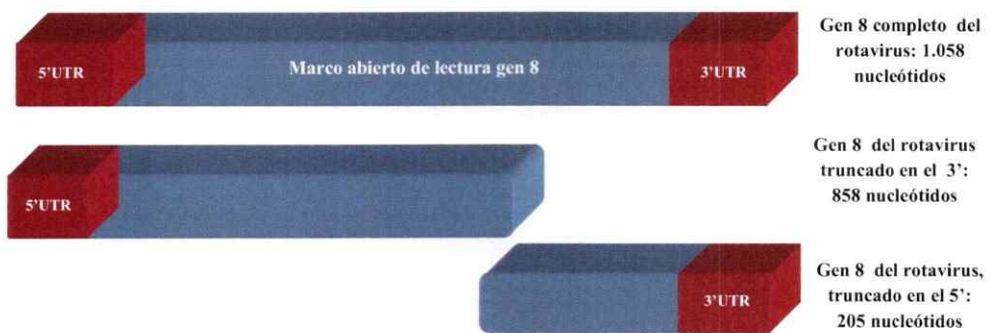


Figura 6b. Esquema de los diferentes transcritos del gen 8 del rotavirus obtenidos en las reacciones de transcripción *in vitro*. En la imagen se muestra un esquema del ssRNA del transcrito completo del gen 8 del rotavirus y de los transcritos del ssRNA mutados en el extremo 3' y 5'.

5.3. Determinar si la unión de VP1 al RNA templado depende de una secuencia en particular.

Antes de estudiar la interacción de VP1 con los diferentes transcritos de RNA, se realizaron ensayos de deposición en mica muscovita, con muestras conteniendo solo RNA (transcrito gen 8 completo del rotavirus). Esto con el fin de permitir una adsorción del RNA a la mica, la cual tiene una superficie cargada negativamente y representa un inconveniente al momento de depositar ácidos nucleicos en este material (Bustamante y Rivetti, 1996). Para ensayos de deposición de ácidos nucleicos en la mica, se recomienda el uso de cationes divalentes a concentraciones de 5-10 mM (Bustamante y Rivetti, 1996). Por este motivo se evaluaron muestras de RNA con ausencia o presencia de $MgCl_2$ en el "buffer" de deposición. En la figura 7 se muestran los resultados del transcrito del gen 8 del rotavirus, fijado a la mica utilizando una concentración de 5 mM de $MgCl_2$ en el "buffer" de deposición. Además en esta figura se observó que el ssRNA adoptó mayormente dos conformaciones, una se nombró "forma de Y" y la otra "lineal". La importancia de estas conformaciones del RNA será abordada mas adelante.

Mientras los ácidos nucleicos se adsorbieron favorablemente a la superficie de la mica con ayuda de cationes divalentes, la proteína VP1 (figura 8) pudo depositarse en la mica sin el empleo de un "buffer" conteniendo $MgCl_2$. Esto se debe a que proteínas con una mayor proporción de aminoácidos con carga positiva, se unen con firmeza a la mica (Oberleithner y col., 1996).

La imagen obtenida de VP1, mostró monómeros de la proteína con una forma esférica. En general las imágenes adquiridas mediante AFM de proteínas globulares que no oligomerizan, aparecen de forma esférica o redondeada (Kiselyova y col., 1999). Se realizó un análisis seccional para determinar la altura de la proteína VP1, en la figura 9 se indica el valor alcanzado por la proteína es de ~1,0 nm. Esta altura de 1,0 nm también se observó en los análisis seccionales practicados a las muestras conteniendo la proteína VP1 con RNA. Este valor de altura es menor en relación al diámetro reportado en estudios de cristalografía de rayos X para la proteína VP1 (~7 nm), como se mencionó en la introducción diversas causas pueden afectar la altura de muestras biológicas analizadas por AFM.

Una de las características funcionales de VP1, es la capacidad de reconocer específicamente la secuencia consenso del extremo 3' de los templados de RNA virales (Lu y col., 2008; Patton, 1996; Tortorici y col., 2003). Por consiguiente, los primeros ensayos para estudiar los complejos de VP1 con los templados de RNA, involucraron la proteína VP1 con el transcrito del gen 8 del rotavirus truncado en el 5' (205 nucleótidos), pero el cual conserva la secuencia consenso 3'(3'CS). En la figura 10 aparece la proteína VP1 unida solo a un extremo del RNA, este resultado demostró que la polimerasa VP1 obtenida del baculovirus recombinante, tiene la capacidad de interactuar con el extremo 3' del RNA.

Dado que en la técnica de AFM, el tamaño del ácido nucleico no es un obstáculo para examinar complejos de RNA-proteína, se estudió la interacción de la proteína VP1 con el transcrito completo del gen 8 del rotavirus. Este transcrito tiene 1.058 nucleótidos, en la figura 11 se detalla la estructura secundaria obtenida mediante el programa MPGAfold (Tortorici y col., 2006). Así mismo, la forma de Y vista por AFM y mostrada en la figura 7, se asemejó a la estructura predicha para el mRNA del gen 8. Con el fin de señalar de manera precisa, los sitios donde se unió la polimerasa VP1 al RNA en forma de Y, se delimitaron regiones en la molécula del RNA nombrándolas: brazos, bifurcación y cuerpo (figura 12). Además se determinó el número de moléculas del ssRNA del gen 8, las cuales adoptaron forma de Y o lineal y si interaccionaron o no con VP1 (Tabla 1). Los resultados de estos experimentos mostraron una mayor presencia de la forma de Y (65,5%), en contraste de la lineal (34,4%). En relación a los datos hallados mediante el programa MPGAfold para el gen 8 (figura 7) y la forma de Y vista por AFM, hace pensar en que esta estructura secundaria adoptada por el transcrito del gen 8 es la mas estable y por ello su predominancia frente a la conformación lineal. También se encontró la proteína VP1 unida con mayor frecuencia al RNA en forma de Y, en los sitios demarcados como bifurcación y los brazos. Se hallaron 33 de 38 moléculas en forma de Y, con este tipo de unión, lo cual corresponde a un 86%. Sólo el 13,1% de moléculas de RNA en forma de Y, se encontraron con VP1 unida a la región del cuerpo (ausencia total de VP1 en los brazos y en la bifurcación).

- El complejo de VP1-ssRNA gen 8 completo (figura 13), es un ejemplo de lo mencionado previamente, en donde la proteína VP1 se unió al ssRNA, en una de las puntas del brazo y otras dos proteínas aparecen unidas a la bifurcación. ¿Por qué VP1 interactúa en sitios determinados del ssRNA en forma de Y? si se analiza nuevamente la estructura secundaria del ssRNA del gen 8 del rotavirus (figura 11) y se compara con la forma de Y del ssRNA, en uno de los brazos se localizan las secuencias consenso 3' y 5', el codón de inicio (AUG), así como señales de reconocimiento del 3' reportadas por Tortorici y col., 2003. Para dilucidar si sólo el extremo 3' del ssRNA del gen 8 está implicado en las señales reconocidas por VP1, se realizaron ensayos con un ssRNA del gen 8 truncado en la secuencia consenso 3' y en regiones no conservadas del ssRNA. En la figura 17 se muestra que la proteína VP1 no interactuó con este ssRNA. Esto demostró que en el ssRNA del gen 8 completo el extremo 3' es clave en el reconocimiento por VP1 y a su vez esta región se ubica en uno de los brazos de la forma de Y del ssRNA del gen 8, vista en AFM.

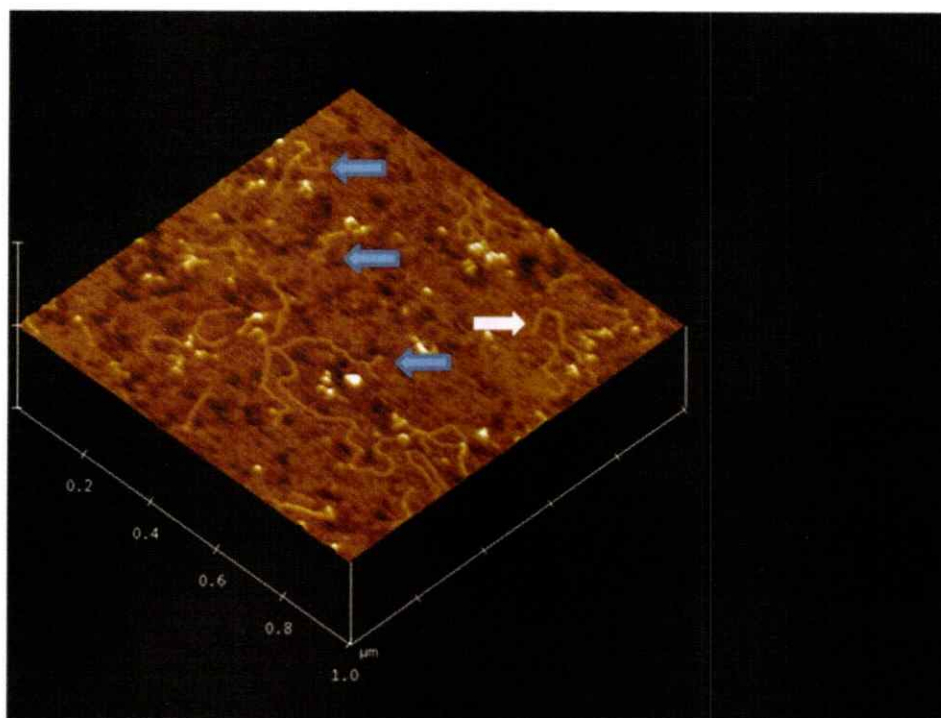


Figura 7. Imagen en 3 dimensiones del transcrito completo del gen 8 del rotavirus (1.058 nucleótidos), obtenida mediante AFM en modo “tapping”. En este ensayo se depositaron en la mica 2 picomoles del ssRNA, utilizando un “buffer” de deposición conteniendo 5 mM de MgCl_2 . Las dos formas predominantes adoptadas por el ssRNA se indican con flechas. La forma de Y aparece indicada con flechas azules y la lineal con blancas.

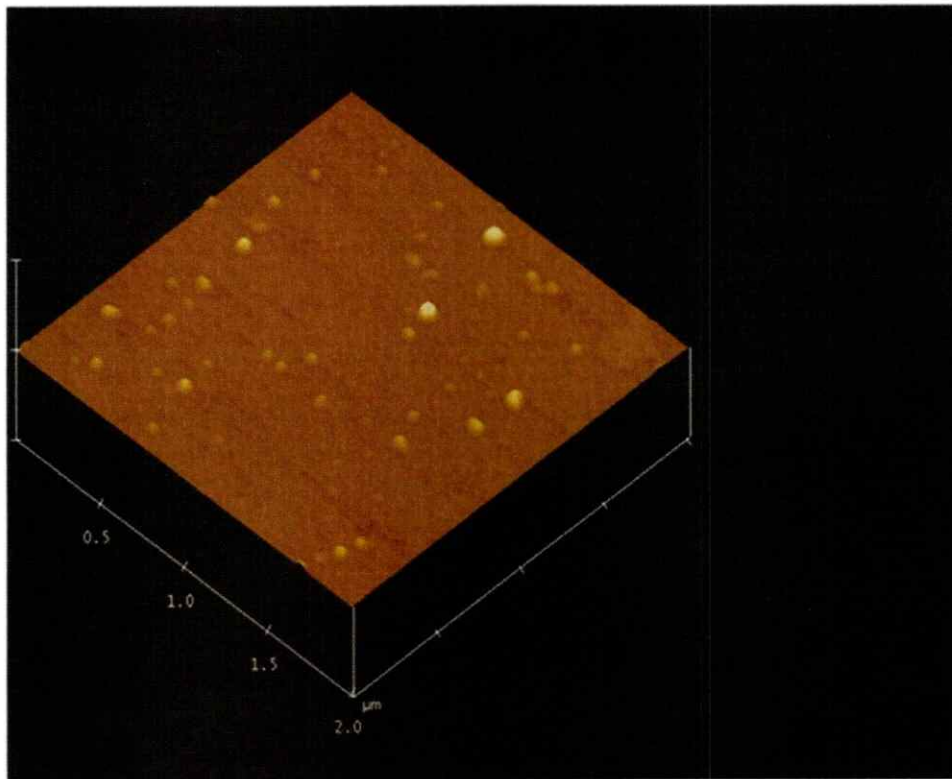


Figura 8. Imagen de la polimerasa del rotavirus VP1, adquirida mediante AFM en modo “tapping”. La proteína VP1 se diluyó a una concentración final de 0,2 picomoles, en un “buffer” conteniendo Tris-HCl 2mM pH 8,0; DTT 0,5 mM y NaCl 50 mM, posteriormente se depositó en la mica según lo descrito en Materiales y Métodos. La imagen capturada por AFM de la proteína mostró monómeros de VP1 con forma esférica y ausencia de agregados. Esta forma esférica de VP1, concuerda por lo reportado para otras proteínas globulares vistas en AFM (Kiselyova y col., 1999).

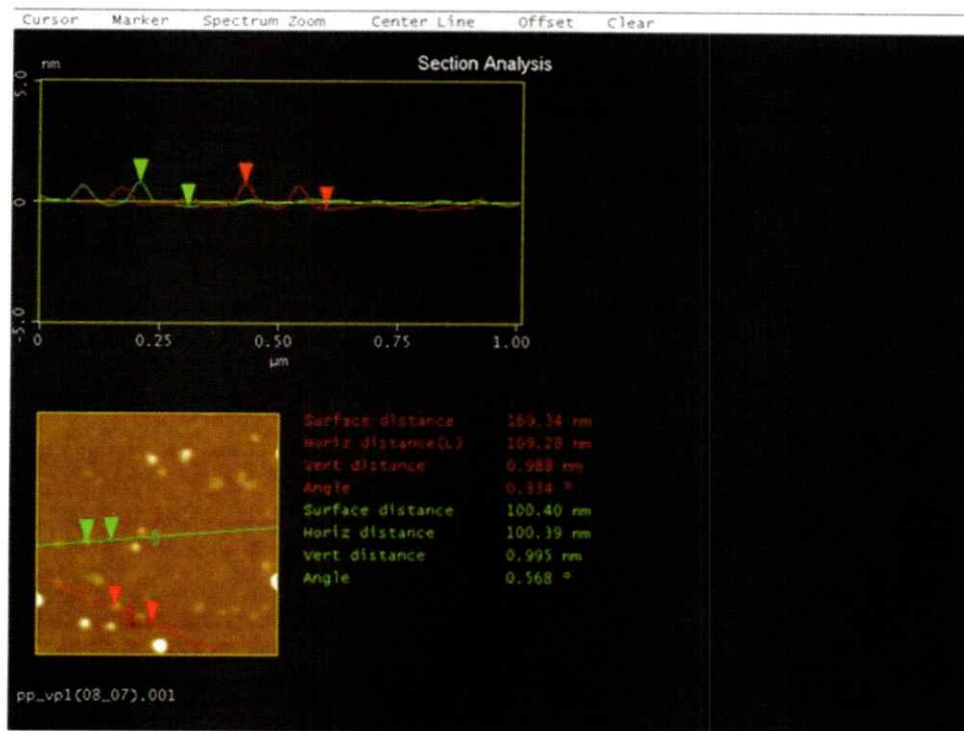


Figura 9. Análisis seccional de la proteína VP1. En la imagen se muestra el análisis seccional, llevado a cabo mediante el programa NanoScope V5 12r4, para determinar la altura de la proteína VP1. En el gráfico del análisis seccional, los “peaks” de los perfiles encontrados en las proteínas de VP1 (señalados en color rojo y verde), mostraron una uniformidad en el valor de la altura de ~1 nm.

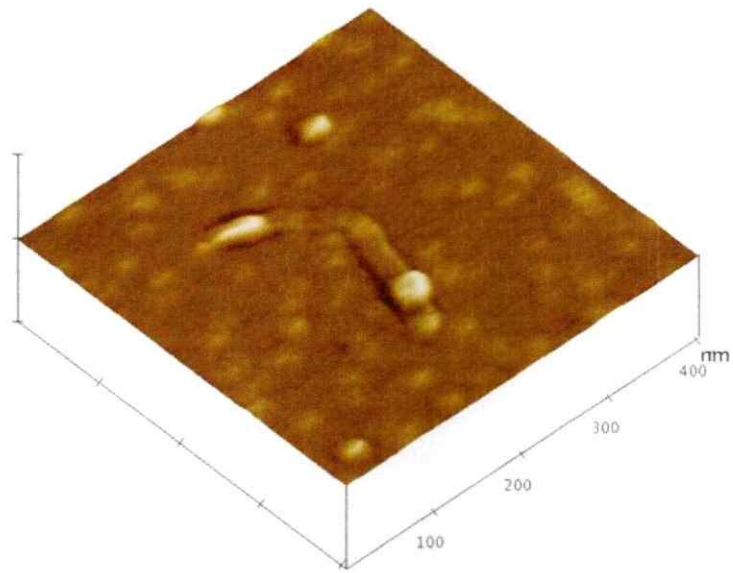


Figura 10. Imagen en 3D obtenida mediante AFM en modo fase, de la proteína VP1 con el ssRNA del gen 8 del rotavirus truncado en el 5'. La imagen corresponde a los resultados de la interacción de VP1 (0,08 picomoles) con el ssRNA del gen 8 truncado en el 5' (1,2 picomoles). La captura de la imagen a 400 nm, mostró la unión de sólo una proteína VP1 a un extremo del ssRNA.

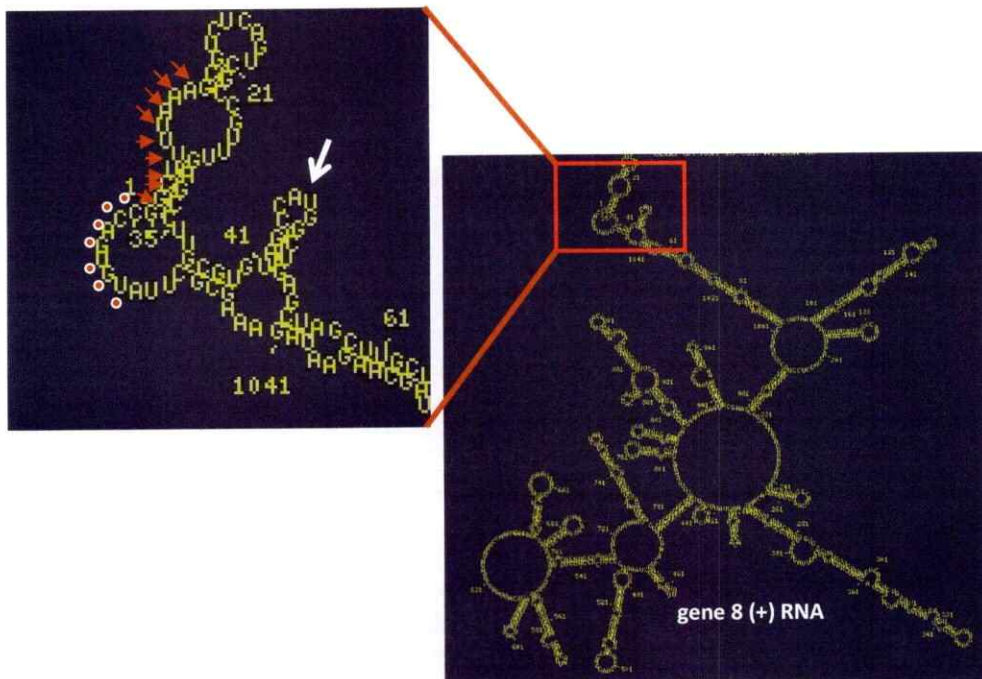


Figura 11. Predicción de la estructura secundaria del ssRNA del gen 8 del rotavirus mediante el programa MPGAfold (Tortorici y col. 2006). En la figura se muestra la estructura secundaria de los 1.058 nucleótidos del ssRNA del gen 8 del rotavirus, en un recuadro se indican las secuencias consenso 5' (flechas rojas) y 3' (círculos rojos). Además se indica el codón de inicio de la traducción (flecha blanca). En el gráfico se evidencia la interacción entre las secuencias consenso 5'y 3' del mRNA, esta interacción también ha sido descrita en las estructuras secundarias de los mRNAs del gen 5 y 11 del rotavirus (Patton y Spencer, 2000).

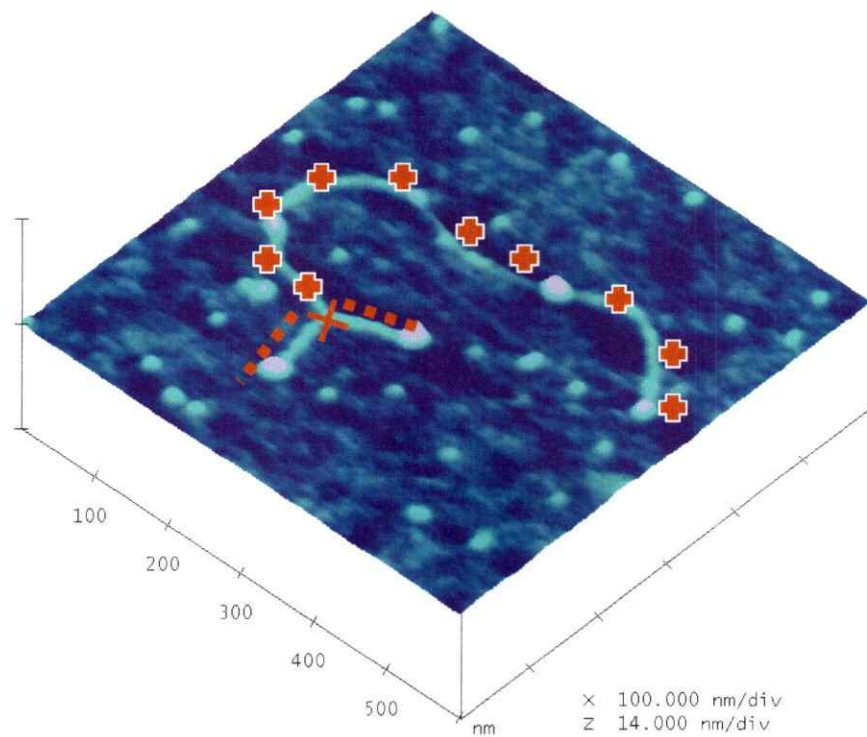


Figura 12. Imagen en 3D obtenida mediante AFM en modo fase del ssRNA gen 8 completo y la polimerasa VP1. Esta imagen se usó para delimitar regiones en el ssRNA gen 8 completo (forma de Y), las cuales se nombraron como bifurcación, brazos y cuerpo. En la molécula del ssRNA del gen 8 completo, los brazos aparecen representados como una línea punteada en color rojo, la bifurcación marcada con una X y el cuerpo se delimitó con cruces rojas. En la figura aparece la proteína VP1 unida a la punta de los brazos y al cuerpo de la molécula del ssRNA.

Conformación	# de moléculas	% moléculas	# de moléculas con VP1 unida	% de moléculas de RNA con VP1 unida
Y	57	65,5 %	38	66,6%
Lineal	30	34,4 %	15	50%
Total	87			

Tabla 1. Cuantificación de las principales conformaciones adoptadas por el transcrito del RNA correspondiente al gen 8 del rotavirus y visualizadas mediante AFM. En la tabla se muestra que predomina la conformación en forma de Y del ssRNA sobre la conformación lineal, así como también hay un porcentaje mayor en la unión de VP1 a la forma de Y del ssRNA.

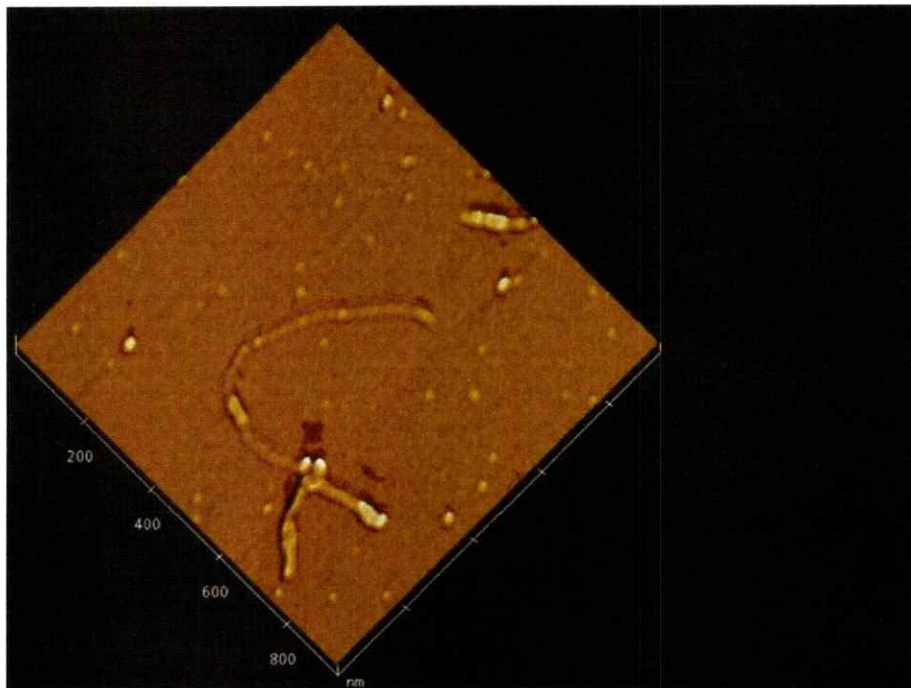


Figura 13. Imagen en 3D del ssRNA gen 8 completo con la proteína VP1, obtenida mediante AFM en modo fase. Para estudiar los complejos de la proteína VP1 con el ssRNA del gen 8, se utilizaron en la mezcla de reacción 0,4 picomoles de ssRNA y 0,12 picomoles de VP1. En la imagen se muestra la forma de Y adoptada por el ssRNA, así como la interacción de VP1 en los sitios mencionados como la bifurcación y la punta de uno de los brazos, en este caso no se observó proteína unida al cuerpo del ssRNA.

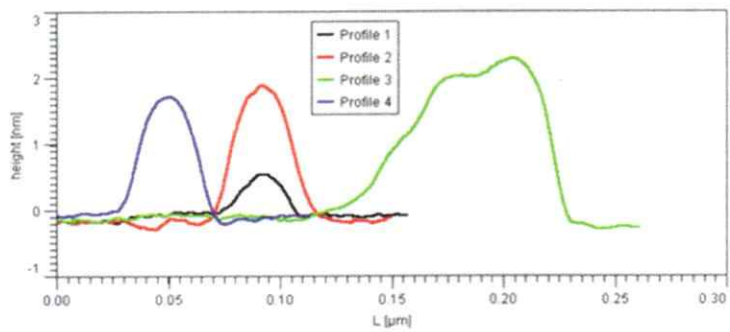
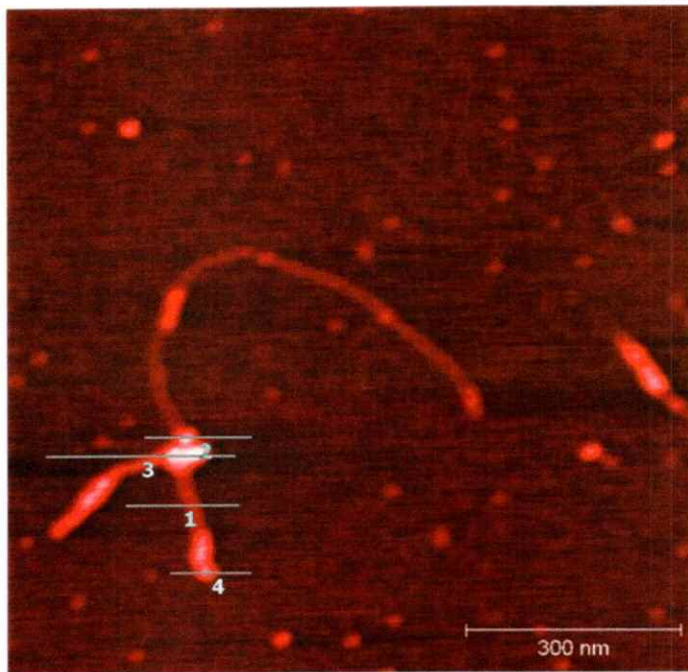


Figura 14. Análisis seccional correspondiente al complejo de VP1 con el ssRNA del gen 8 completo.

Figura 14. Análisis seccional correspondiente al complejo de VP1 con el ssRNA del gen 8 completo. La molécula del ssRNA del gen 8 aparece acompañada con la proteína VP1 en los sitios del brazo y la bifurcación. El análisis seccional de este complejo, mostró que la medición del ssRNA (perfil 1/color negro) de 0,5 nm correspondió a los valores reportados en otros estudios de AFM con RNA de hebra simple (Dryging y col., 1998; Henn y col., 2001). En los perfiles 2 (color rojo) y 4 (color azul), la medición de altura estuvo cercana a los 2 nm, debido a la presencia de la proteína interaccionando con el ssRNA. En contraste a los “peaks” de los perfiles 2 y 4, el “peak” observado en el perfil 3 (color verde), se mostró más amplio y ligeramente superior a los 2 nm, esto se explica porque la proteína cercana (perfil 2) influyó en la medición de altura del perfil 3.

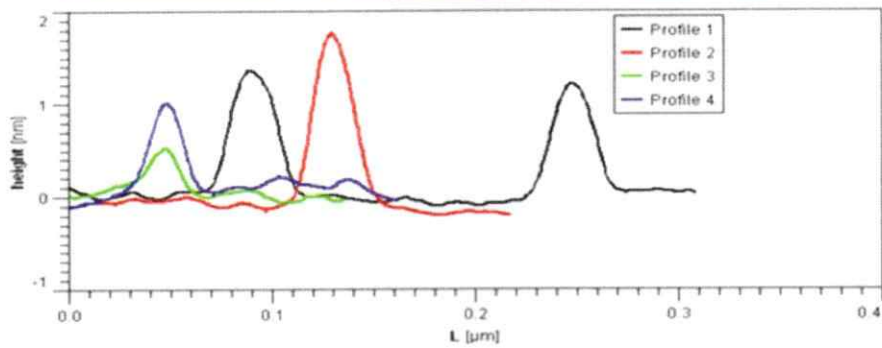
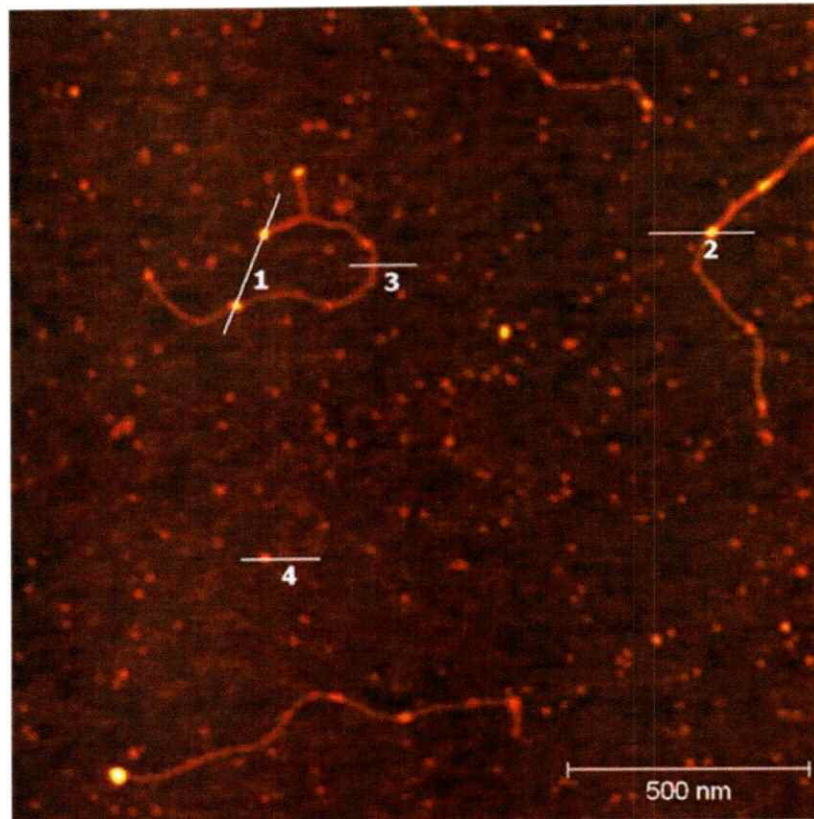


Figura 15. Análisis seccional correspondiente al complejo de VP1 con el ssRNA del gen 8 completo.

Figura 15. Análisis seccional correspondiente al complejo de VP1 con el ssRNA del gen 8 completo. En esta imagen se muestra el análisis seccional realizado al complejo de ssRNA gen 8 (0,4 picomoles) con VP1 (0,12 picomoles). El perfil del análisis seccional realizado a la proteína VP1 libre (perfil 4/color azul), dio un valor de altura de 1 nm, este dato concuerda con los resultados descritos en la figura 9, donde se determinó la altura de la proteína VP1. A la medición de altura del ssRNA (perfil 3/color verde), nuevamente correspondió un valor de 0,5 nm. Los perfiles 1 y 2 identificados con colores negro y rojo respectivamente, involucraron mediciones de altura del ssRNA con proteína VP1 unida, los valores obtenidos estuvieron entre 1,5 nm y 1,8 nm.

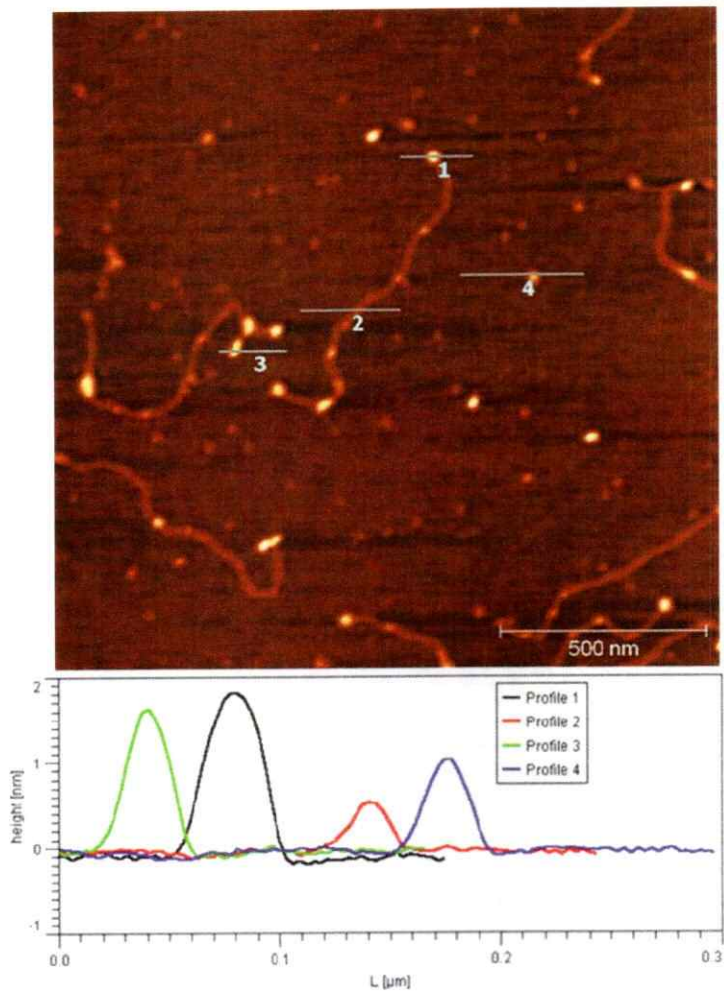


Figura 16. Análisis seccional correspondiente al complejo de VP1 con el ssRNA del gen 8 completo.

Figura 16. Análisis seccional correspondiente al complejo de VP1 con el ssRNA del gen 8 completo. La imagen muestra el análisis seccional realizado al ssRNA gen 8 (0,4 picomoles) con la proteína VP1 (0,12 picomoles). Los perfiles de altura de la proteína VP1 unida al ssRNA (perfil 1 y 3), mostraron un valor entre 1,7 nm y 1,9 nm. En cuanto a los análisis del ssRNA (perfil 2) y la proteína VP1 (perfil 4), tuvieron un valor en la altura de 0,5 nm y 1 nm, respectivamente.

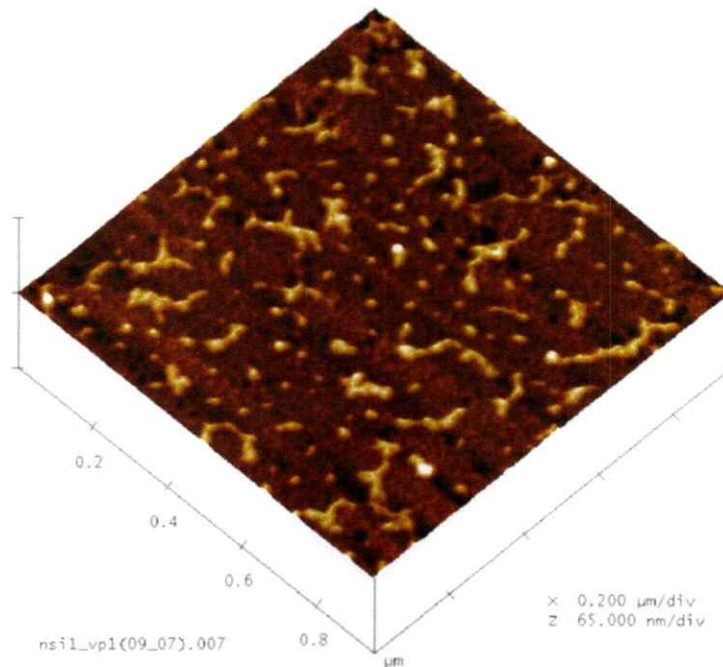


Figura 17. Imagen en 3D obtenida mediante AFM en modo “tapping”, de la proteína VP1 con el ssRNA del gen 8 del rotavirus truncado en el 3’. Para determinar si la proteína VP1 interaccionaba con el ssRNA del gen 8 truncado en 200 nucleótidos del extremo 3’, se llevaron a cabo diferentes ensayos, en donde 0,3 picomoles del ssRNA, se mezclaron con 0,06 picomoles de la proteína VP1 y se depositaron en la superficie de la mica según lo descrito en Materiales y Métodos. En los resultados mostrados en esta imagen se observó que la proteína VP1 no interaccionó con el ssRNA truncado en el 3’, no se presentó una forma de ssRNA predominante u homogénea, mas bien el ssRNA tendió a formas mas agregadas y compactas.

5.2. Estudio de complejos individuales de NSP2 y NSP5 mediante AFM

La proteína NSP5 (26 kDa) usada en los ensayos de AFM, se obtuvo de un baculovirus recombinante expresado en células de insecto. Por las características ligeramente ácidas de esta proteína (Vende y col., 2002), se utilizó el “buffer” de deposición para unir NSP5 a la superficie de la mica. En la figura 18, se mostró la proteína NSP5 organizada en estructuras diméricas. Por estudios previos se sabe que la proteína NSP5 puede dimerizar, en donde el dominio C-terminal de la proteína es esencial para esta función (Torres-Vega y col., 2000). En la figura 19, se indica el análisis seccional de la proteína NSP5, el cual dio un valor de altura de 0,6 nm. Como se señaló en la introducción, en AFM las medidas de altura de muestras biológicas, pueden verse afectada por múltiples factores. Sin embargo si se comparan los valores de altura de la proteína VP1 (1 nm), con los de la proteína NSP5 (0,6 nm), en estos ensayos de AFM hay una proporción directa entre el tamaño de la proteína y el valor de altura encontrado.

La proteína NSP2 se obtuvo de bacterias *E. coli* conteniendo el vector pQE60-NSP2 *wt*. En la figura 20 se muestran los resultados de AFM de la proteína NSP2 y en la figura 21 se indica el análisis seccional realizado a la proteína NSP2, aunque en este ensayo aparece proteína acomplejada con ssRNA del gen 8 completo, sólo se consideraron para las mediciones de altura las proteínas libres de ssRNA. Los valores de altura de NSP2 estuvieron entre 3,3 nm y 4 nm.

Es importante recordar la capacidad de NSP2 de multimerizar en una estructura nombrada como octámero (Schuck y col., 2000), la cual tiene un peso molecular de ~280 kDa, por esto se esperaba una mayor altura de NSP2 con respecto a las proteínas VP1 y NSP5.

En cuanto a los valores de altura observados en NSP2, se ha descrito en AFM proteínas de gran tamaño o de formas asimétricas, mostrando una distribución variable en las medidas de altura, relacionada con una mayor opción de estas proteínas de cambiar la orientación espacial al momento de fijarse a la superficie de la mica (Kiselyova y Yaminsky, 2003).

Con el fin de estudiar los complejos de NSP2-NSP5, se realizaron ensayos donde se mezclaron 2 picomoles de NSP2 con 0,8 picomoles de NSP5 y se fijaron a la mica con el "buffer" de deposición conteniendo 5 mM de MgCl₂. En la figura 22 se señalan los resultados obtenidos mediante AFM de los complejos NSP2-NSP5. Estudios previos de criomicroscopía electrónica, sugieren que el dímero de NSP5 interacciona con NSP2 (Jiang y col., 2006). Si bien en la figura 22 se alcanzó a apreciar en algunos complejos de NSP2-NSP5, la unión de solo un monómero de NSP5 a la proteína NSP2, una amplificación de estos complejos confirmó esta observación (figura 23). Así mismo en el análisis seccional de los complejos NSP2-NSP5 (figura 24), se encontró una disminución en la altura de estas proteínas al contrastar los análisis seccionales individuales de las proteínas NSP5 (figura 19) y NSP2 (figura 21). En detalle la altura de la proteína NSP2 pasó de ~4 nm (figura 24) a 2,7 nm (figura 21) y la de NSP5 varió de 0,6 nm (figura 19) a ~0,3 nm (figura 24).

El por qué del cambio en la altura de estas proteínas, cuando forman el complejo NSP2-NSP5 no se sabe con certeza.

Nuevamente cabe la posibilidad de atribuir la alteración en el valor de altura, a lo mencionado con anterioridad para muestras biológicas analizadas por AFM.

Por otro lado se ha descrito que la unión de nucleótidos al octámero de NSP2, ocasiona cambios conformacionales y permiten una forma mas compacta del octámero (Schuck y col., 2001). La interacción de las proteínas NSP2 y NSP5 induce la formación de viroplasmos, pero hasta el momento no hay estudios indicando un efecto de NSP5 en la estructura del octámero.

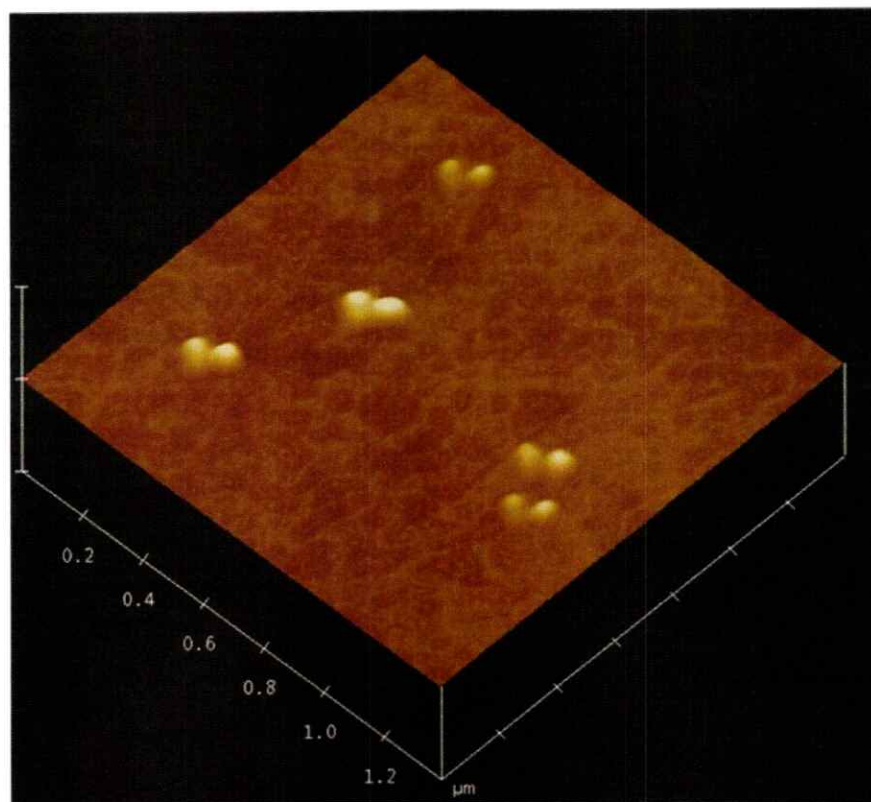


Figura 18. Imagen en 3D de la proteína NSP5 adquirida mediante AFM modo “tapping”. En este ensayo 0,9 picomoles de NSP5 se adsorbieron en la mica, utilizando el “buffer” de deposición conteniendo 5 mM de $MgCl_2$. En la imagen aparece NSP5 en formas diméricas, esto corresponde a una de las características reportadas para esta proteína (Torres-Vega y col., 2000).

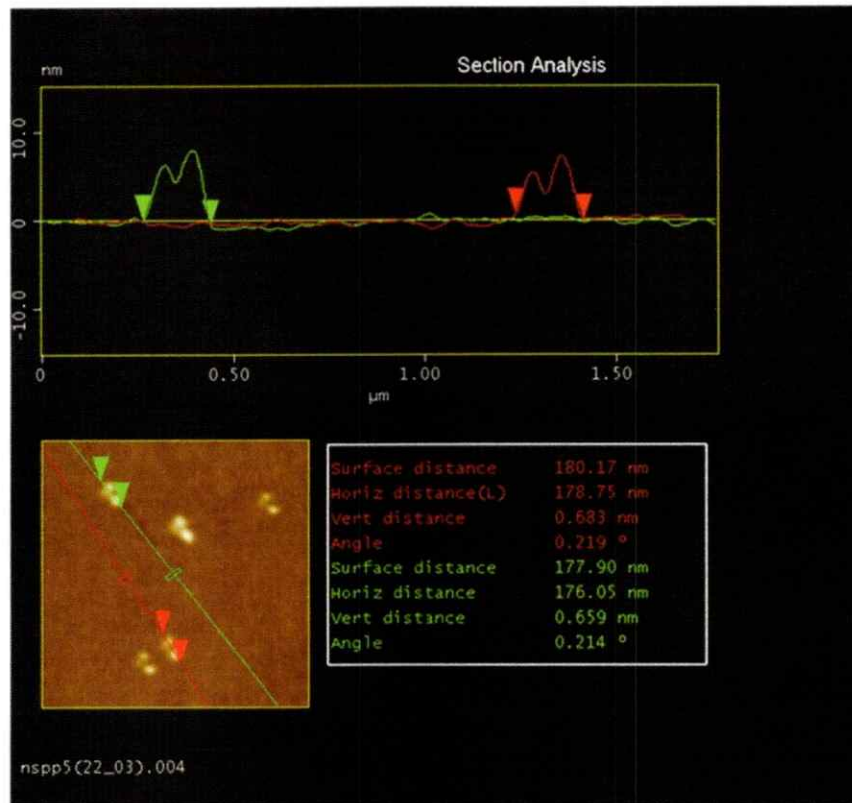


Figura 19. Análisis seccional de la proteína NSP5. El análisis seccional realizado a dos proteínas de NSP5 se diferenció en color rojo y verde, estas proteínas mostraron alturas de 0,6 nm. Si se observan los perfiles de altura de cada proteína NSP5 (identificadas en color rojo y verde), se ven dos “peaks” asimétricos, lo cual indica la presencia de dos formas esféricas. Esta particularidad en los perfiles de altura ha sido descrita en proteínas diméricas analizadas mediante AFM (Kiselyova y Yaminsky, 2003).

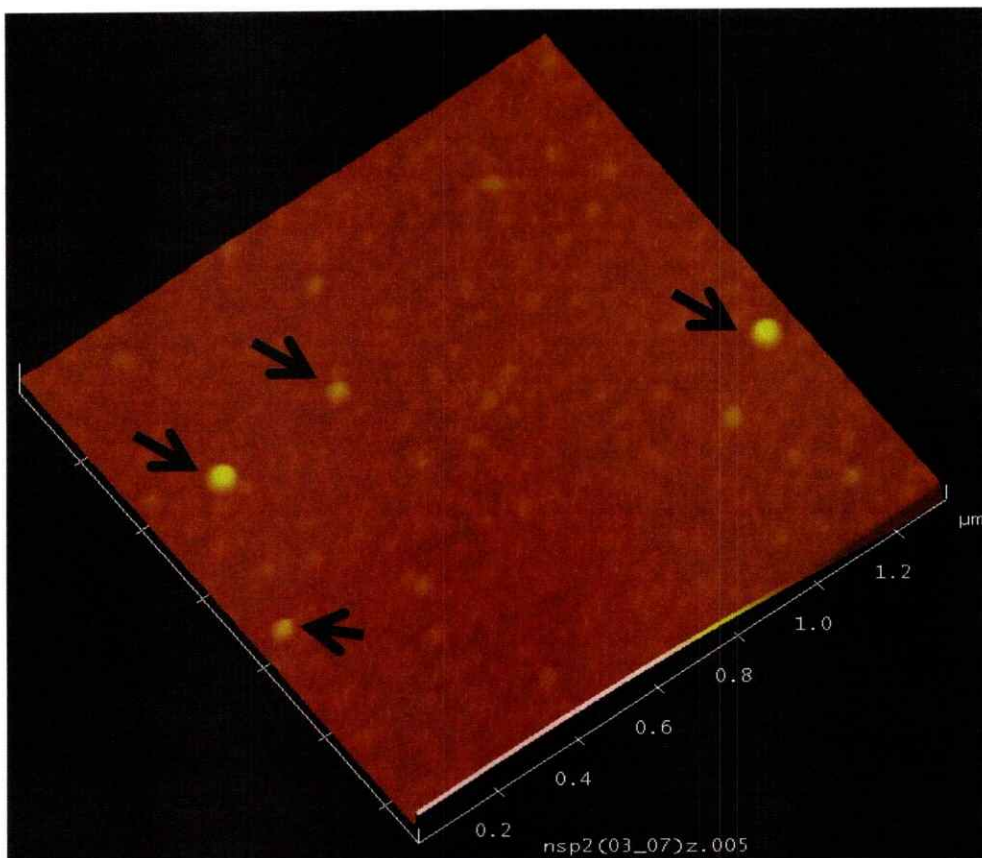


Figura 20. Imagen en 3D de la proteína NSP2 obtenida mediante AFM modo “tapping”. En este ensayo la proteína NSP2 (0,2 picomoles), se resuspendió en un “buffer” conteniendo Tris-HCl 2 mM pH 8,0; DTT 0,5 mM y NaCl 50 mM y posteriormente se depositó en la mica muscovita. La proteína NSP2 aparece en forma esférica y señalada con flechas negras.

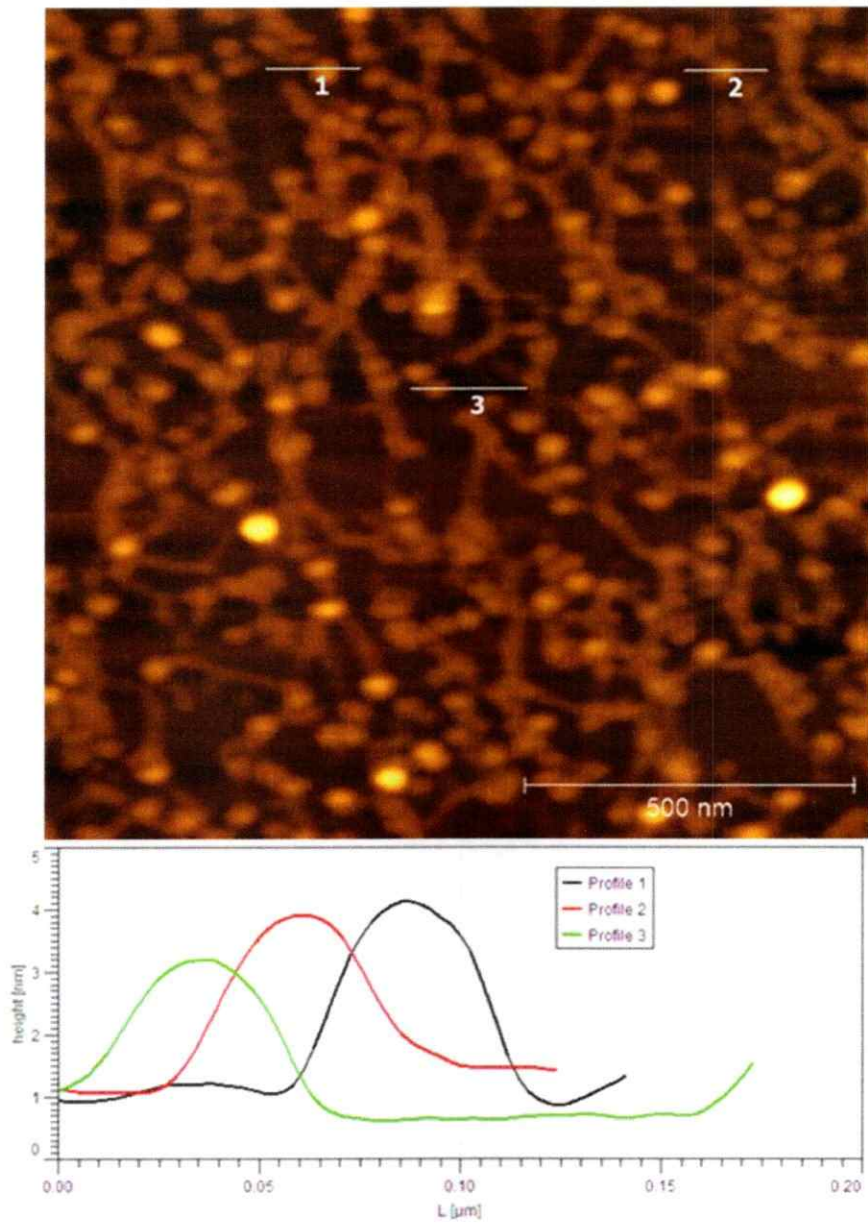


Figura 21. Análisis seccional de la proteína NSP2.

Figura 21. Análisis seccional de la proteína NSP2. La imagen corresponde al análisis seccional realizado a la proteína NSP2, en el panel inferior el gráfico muestra la medición de altura de tres proteínas NSP2. La altura de NSP2 osciló entre los 3,3 nm (perfil 3/color verde) y ~4 nm (perfil 1/negro y perfil 2/rojo).

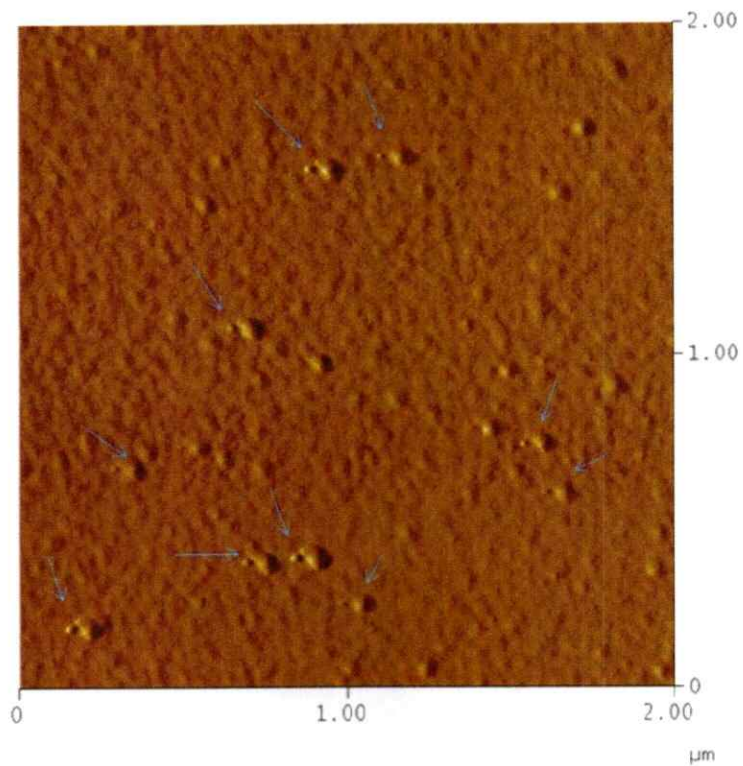


Figura 22. Imagen en 2D de los complejos NSP2 y NSP5 obtenidos mediante AFM modo “tapping”. En este experimento se usaron 2 picomoles de la proteína NSP2 y 0,8 picomoles de NSP5. En la imagen aparecen complejos de NSP2-NSP5 (se señalan con flechas azules), se observa unido a la proteína NSP2 un monómero del dímero de NSP5.

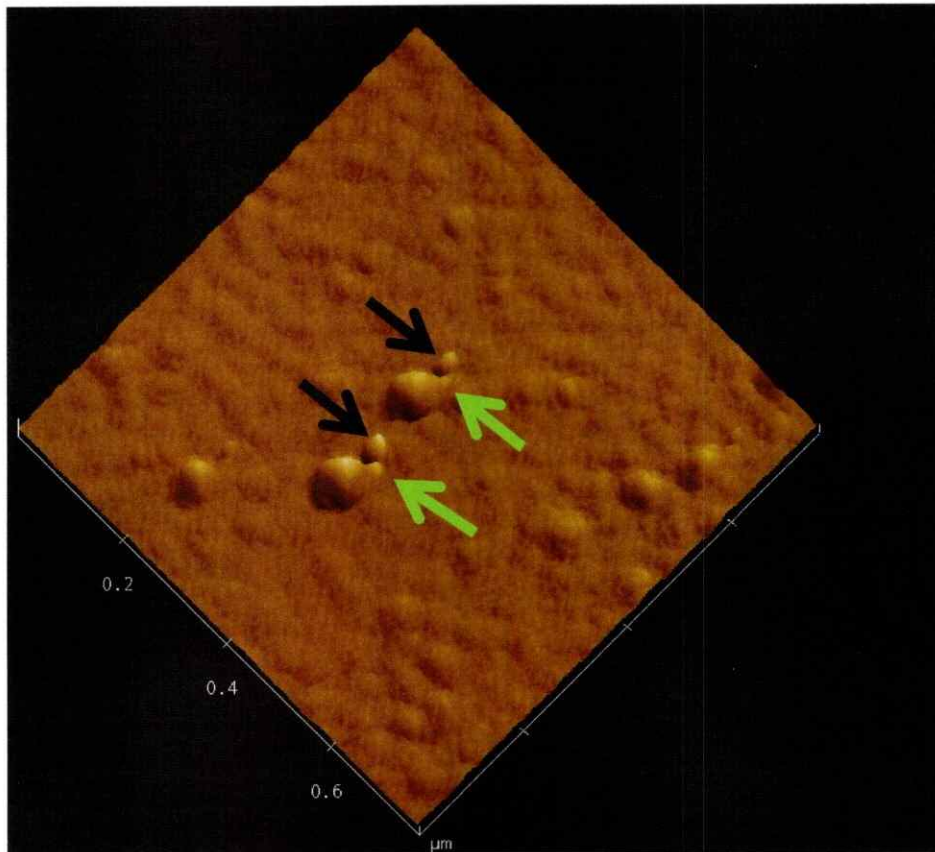


Figura 23. Imagen en 3D de los complejos NSP2-NSP5 visualizados mediante AFM modo “tapping”. En esta figura se muestran los resultados de un acercamiento realizado a los complejos de NSP2-NSP5, las flechas negras indican el monómero del dímero de NSP5 que no se une a NSP2 y la flechas verdes el monómero de NSP5 acoplado a NSP2.

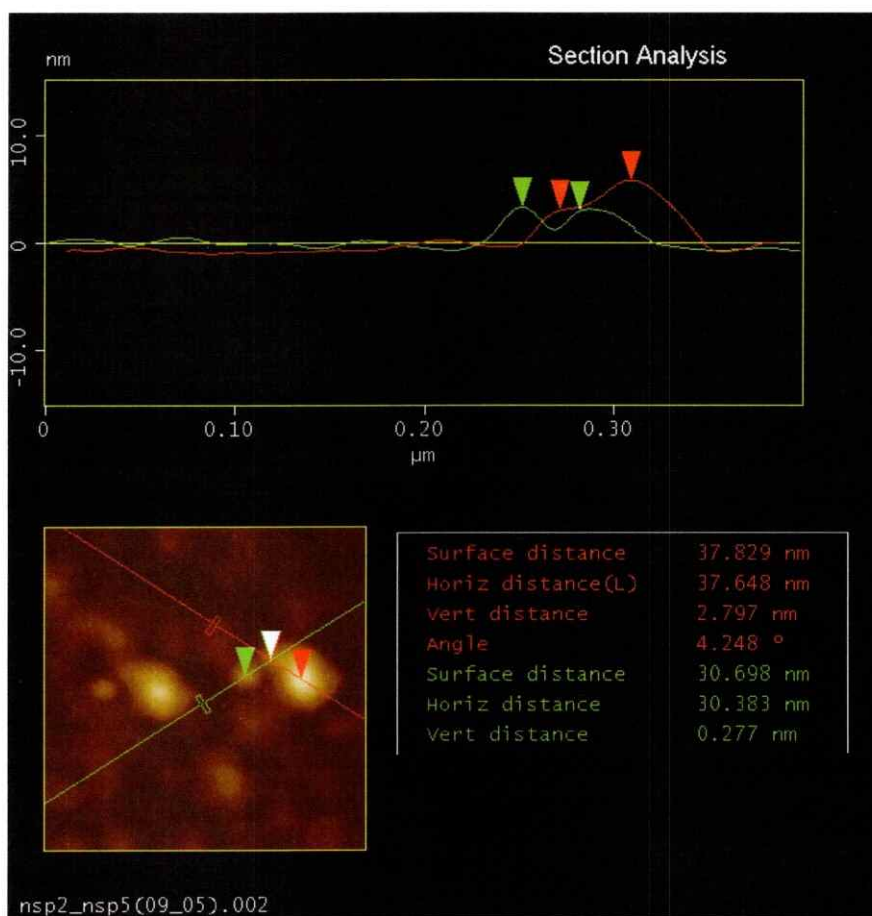


Figura 24. Análisis seccional del complejo NSP2-NSP5. La imagen corresponde al análisis seccional realizado al complejo NSP2-NSP5, el perfil de altura de la proteína NSP5 se señala en color verde y el de la proteína NSP2 en color rojo. La altura de la proteína NSP5 alcanzó un valor cercano a 0,3 nm y la de NSP2 2,8 nm. El perfil de altura de NSP2 mostró dos “peaks”, en donde el “peak” mas bajo corresponde a la medida de altura del monómero de NSP5 ensamblado a NSP2, este valor de altura concuerda con la altura del monómero de NSP5 que permanece sin unirse a NSP2.

5.3. Estudio de la interacción de NSP2 y NSP5 con el ssRNA templado

Como se mencionó en la introducción la interacción de las proteínas NSP2-NSP5, tiene como consecuencia la formación de los viroplasmos, a su vez en los viroplasmos se encuentran ssRNAs virales, usados como plantillas para la síntesis del dsRNA genómico (Silvestri y col., 2004). También se sabe que las proteínas NSP2 y NSP5, unen ssRNA aunque de manera inespecífica (Taraporewala y col., 1999) y hacen parte de los llamados intermediarios de replicación (RIs). Dada la importancia de los complejos de ssRNAs virales con las proteínas NSP2-NSP5 y en relación a lo hallado en este trabajo con la proteína VP1 y el ssRNA templado: i) ¿las proteínas NSP2 y NSP5 se unen al igual que VP1 a sitios determinados en el ssRNA en forma de Y? ii) ¿en presencia del ssRNA templado permanecen asociadas las proteínas NSP2 y NSP5 en los complejos mostrados previamente por AFM?

Por todo lo anterior se abordará en este objetivo, el estudio de las proteínas NSP2 y NSP5, con el templado del RNA correspondiente a un transcrito del gen 8 del rotavirus.

La reacción de la proteína NSP5 con el ssRNA (transcrito completo del gen 8 del rotavirus), se llevó a cabo en un “buffer” conteniendo espermidina a una concentración de 0,05 mM. La espermidina ha sido utilizada en ensayos de AFM para visualizar muestras de DNA de hebra simple (ssDNA) con la proteína SSB (Hamon y col., 2007). Se optó por el uso de espermidina debido a intentos fallidos de depositar en la mica, los complejos de NSP5-ssRNA con el “buffer” de deposición conteniendo $MgCl_2$.

La figura 25 corresponde a los ensayos de AFM con la proteína NSP5 y el ssRNA, en la imagen aparecen complejos de ssRNA con proteína y a la vez hay ssRNA sin proteína acomplejada. También la proteína NSP5 unida al ssRNA formó agregados y el ssRNA se observó mas compacto. Aunque se evaluaron diferentes concentraciones de ssRNA y NSP5, se obtuvieron resultados similares a los mostrados en la figura 25. Sin embargo al analizar complejos de dsRNA genómico del rotavirus con la proteína NSP5 (figura 26), estos aparecen con proteína dispuesta de forma más organizada a lo largo del dsRNA, en lo cual monómeros de NSP5 se unen de manera semejante a las cuentas de un collar. De igual manera por ensayos de competencia se ha demostrado que NSP5, tiene afinidad similar por el ssRNA y el dsRNA (Vende y col., 2002). Sin embargo en estos ensayos de AFM con NSP5-ssRNA y/o dsRNA, si llamó la atención la diferencia en el modo de unión de NSP5 al ssRNA y al dsRNA. No se descarta lo postulado por algunos autores sobre la proteína NSP5, la cual puede actuar como “secuestradora” del dsRNA en el ciclo viral, manteniendo suprimida la vía de activación de la proteína quinasa PKR, favoreciendo una infección productiva al inactivar factores antivirales en la célula huésped (Patton y col., 2006a; Vende y col., 2002). En cuanto a los complejos vistos con la proteína NSP5 y el ssRNA, dada la función de NSP5 en la formación de viroplasmos, sitios donde se concentran proteínas involucradas en la morfogénesis del rotavirus y también los ssRNAs templados, cabe la posibilidad que NSP5 al agregarse con el ssRNA viral lo proteja de la degradación por RNAasas (Silvestri y col., 2004).

Los ensayos de NSP2 con ssRNA (transcrito del gen 8 completo del rotavirus), se llevaron a cabo con 0,01 picomoles de NSP2 y 0,8 picomoles de ssRNA en un "buffer" conteniendo Tris-HCl 2 mM pH 8,0; DTT 0,5 mM y NaCl 50 mM. En la figura 27 se muestran los complejos de la proteína NSP2 con el ssRNA, en esta imagen aparece NSP2 dispuesta sobre el ssRNA de manera semejante a un polisoma. La formación de estos complejos se relaciona con una de las funciones descritas para NSP2, la actividad desestabilizadora de doble hélice (Taraporewala y Patton, 2001). En esta actividad el octámero de NSP2 se unen al ssRNA de manera cooperativa y esta cooperatividad es crítica para remover las estructuras secundarias de los ssRNAs templados virales (Taraporewala y Patton, 2001).

Para determinar si los complejos formados por las dos proteínas no estructurales NSP2-NSP5 se unen a un sitio determinado del ssRNA templado; se utilizaron 3 picomoles de NSP5, 1,4 picomoles de NSP2 y 0,04 picomoles del ssRNA templado. La reacción se realizó en un "buffer" conteniendo: Tris-HCl 2 mM pH 8,0; DTT 0,5 mM, NaCl 50 mM y MgCl₂ 2,5 mM. Los resultados de estos estudios no mostraron complejos evidentes de NSP2-NSP5-ssRNA (figura 28), mas bien se observaron formas agregadas, semejante a lo visto con el ssRNA y NSP5 (figura 25). Debido a esto no se logró establecer si estas proteínas no estructurales en forma acomplexada, interaccionan de manera similar a lo encontrado en este trabajo con la proteína VP1 y el ssRNA templado en forma de Y.

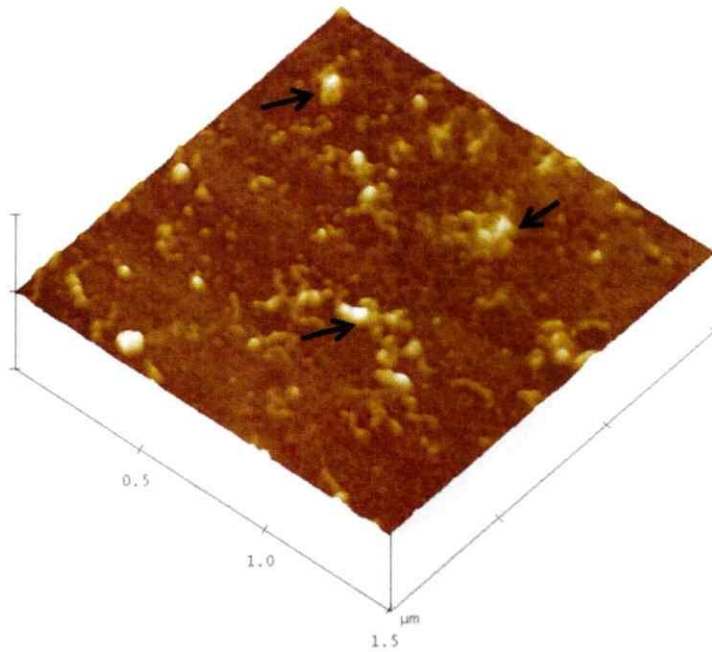


Figura 25. Imagen en 3D de NSP5 con el ssRNA (transcrito del gen 8 completo del rotavirus), obtenida mediante AFM en modo “tapping”. En este ensayo 0,5 picomoles de NSP5 se incubaron con 0,17 picomoles de ssRNA en el siguiente “buffer”: Tris-HCl 2 mM pH 8,0; DTT 0,5 mM, NaCl 50 mM y espermidina 0,05 mM. En la imagen se observan complejos de NSP5 con ssRNA y también ssRNA libre de proteína. En los complejos NSP5-ssRNA, la proteína aparece en forma agregada sobre el ssRNA (se señalan algunos complejos con flechas negras). El ssRNA libre o no de proteína NSP5, adoptó conformaciones mas compactas en comparación a los ensayos descritos con VP1-ssRNA.

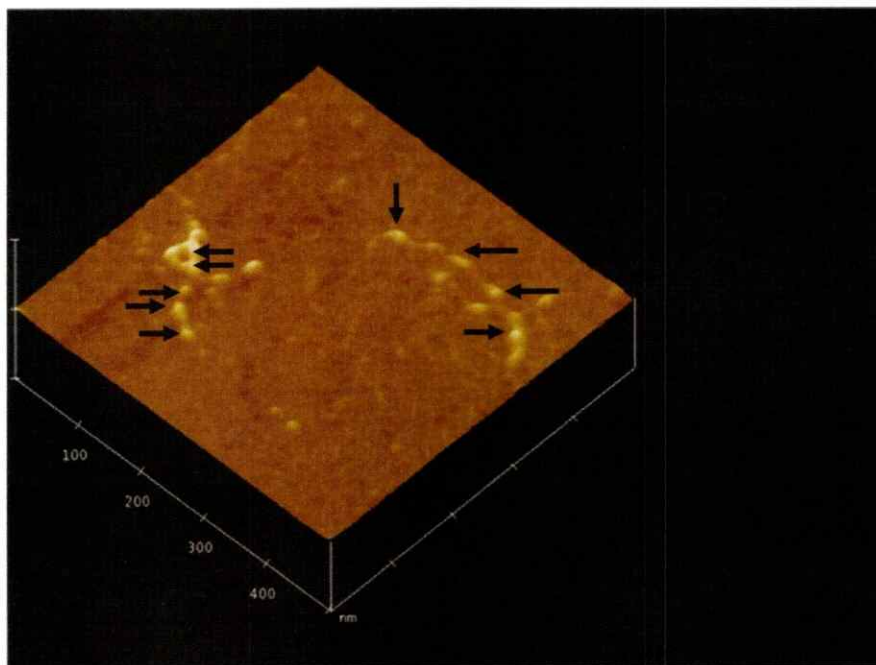


Figura 26. Imagen en 3D de AFM en modo “tapping”, correspondiente a la proteína NSP5 con el dsRNA genómico del rotavirus (cepa SA11-4F). El dsRNA genómico se obtuvo a partir de células MA-104 infectadas con la cepa del rotavirus SA11-4F. En este ensayo se utilizaron 0,6 picomoles de la proteína NSP5 con el dsRNA genómico del rotavirus y los complejos se adsorbieron en la mica con el “buffer” de deposición a una concentración de 5 mM de $MgCl_2$. En la imagen aparecen dos complejos de NSP5-dsRNA, en donde se indican con flechas negras la distribución de la proteína NSP5 en el dsRNA.

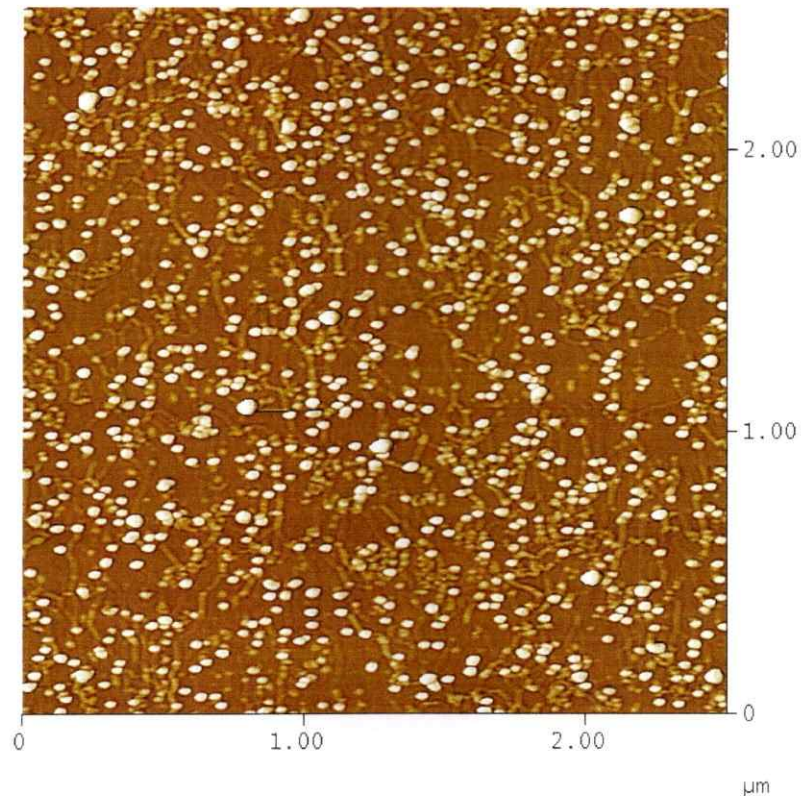


Figura 27. Imagen en 2D de complejos de NSP2 con el ssRNA (transcrito gen 8 completo del rotavirus), obtenida mediante AFM modo fase. En este experimento la proteína NSP2 (0,01 picomoles) se mezcló con el ssRNA (0,8 picomoles) en el “buffer” conteniendo Tris-HCl 2 mM pH 8,0; DTT 0,5 mM y NaCl 50 mM. En la imagen el modo de unión de NSP2 al ssRNA se asemeja a un polisoma. Los complejos de NSP2-ssRNA observados, concuerdan en como se lleva a cabo la actividad desestabilizadora de doble hélice descrita para NSP2 (Taraporewala y col., 2001), en donde la unión cooperativa del octámero de NSP2 al ssRNA favorece la remoción de estructuras secundarias en los ssRNAs virales, utilizados como templados en la replicación del genoma del rotavirus.

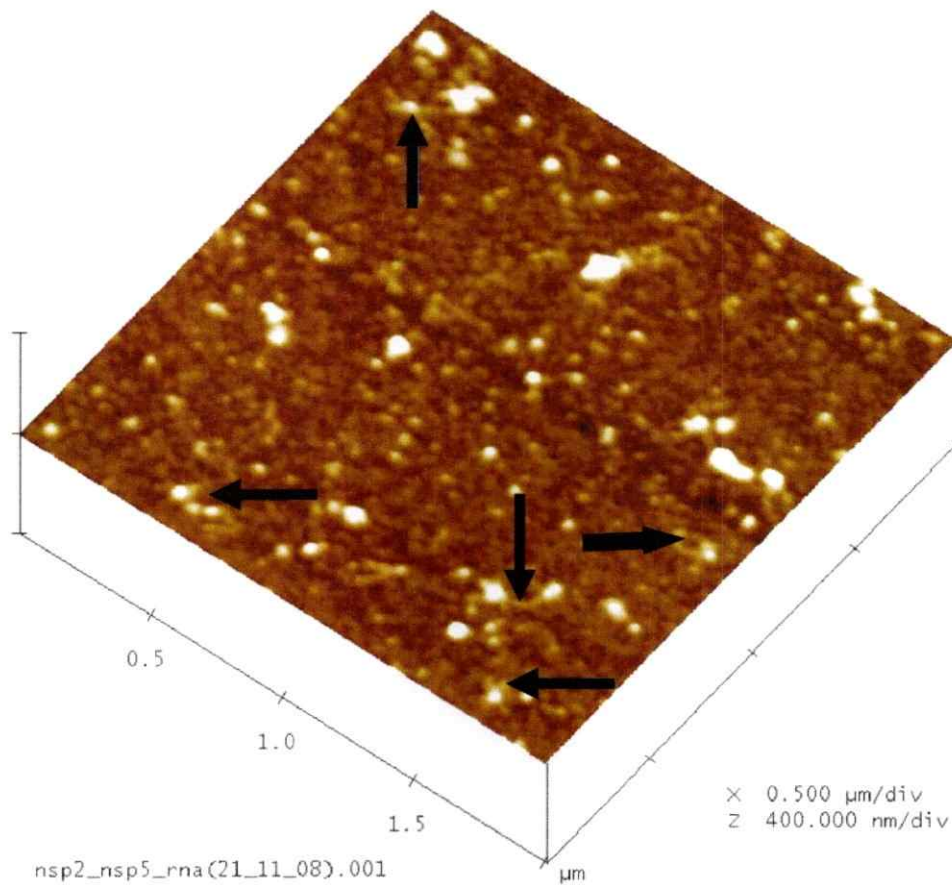


Figura 28. Imagen en 3D de los complejos de NSP2-NSP5 y ssRNA (transcrito gen 8 completo del rotavirus), obtenidas mediante AFM modo “tapping”. La imagen corresponde a los resultados obtenidos, con la mezcla de reacción conteniendo NSP5 (3 picomoles), NSP2 (1,3 picomoles) y ssRNA (0,04 picomoles). Los ensayos se realizaron en el “buffer” siguiente: Tris-HCl 2 mM pH 8,0; DTT 0,5 mM, NaCl 50 mM y MgCl₂ 2 mM. Los complejos NSP2-NSP5-ssRNA aparecen de forma agregada (indicado por flechas negras), debido a esto no se pudo demostrar si estas proteínas interaccionan en el ssRNA templado en un sitio determinado.

DISCUSIÓN

En el ciclo viral del rotavirus aún se desconocen eventos importantes de la morfogénesis viral, relacionados a la selección simultánea de los 11 RNAs templados, su encapsidación y posterior replicación. En relación a este tema, una de las causas principales es la ausencia de un sistema de genética reversa eficaz en el rotavirus. Hasta ahora sólo se ha desarrollado un método de genética reversa en el rotavirus, el cual presentó algunos problemas como: baja recuperación de virus recombinantes después de una selección tediosa y la no aplicabilidad de la técnica a proteínas virales no estructurales (Komoto y col., 2006).

En el rotavirus dos proteínas no estructurales, NSP2 y NSP5, se sabe que son importantes en la replicación del genoma viral y muy seguramente en la encapsidación del ssRNA templado (Taraporewala y Patton, 2004). Los análisis realizados a los intermediarios de replicación (RIs), han identificado a estas dos proteínas no estructurales acomplejadas con proteínas del *core* viral. La proteína VP1, la polimerasa viral hace parte del *core* e interactúa con NSP2 y NSP5 (Arnoldi y col., 2007). Mientras VP1 puede unirse de manera específica al extremo 3' del ssRNA templado, las proteínas NSP2 y NSP5 interaccionan con el ssRNA de manera inespecífica (Patton y col., 2003). Estas interacciones entre el templado del ssRNA con la polimerasa VP1 y/o con las dos proteínas no estructurales NSP2 y NSP5 son de interés en esta tesis, porque nos puede ayudar a comprender de cierta manera la morfogénesis del rotavirus en sus etapas iniciales.

En este trabajo se estudió la interacción *in vitro* de las proteínas VP1, NSP2 y NSP5 con el ssRNA templado, se utilizó la técnica de AFM para visualizar y analizar los complejos formados.

En el virus *phi 6* el desarrollo de un sistema *in vitro*, ha permitido dilucidar como es el proceso de encapsidación de los tres segmentos del ssRNA templado, en donde la proteína P4 con su actividad NTPasa asiste en la encapsidación del ssRNA templado (Poranen y Tuma, 2004). Este sistema no puede aplicarse en el rotavirus, porque en el fago *phi 6* los ssRNA templados, son replicados sólo cuando se encuentran completamente encapsidados en una estructura tipo *core* viral.

Si bien la técnica de AFM en sus comienzos tuvo una aplicación hacia la ciencia de los materiales, en los años posteriores a su invención se amplió su uso a las ciencias biológicas (Parot y col., 2007). Así el AFM es una herramienta para el estudio de complejos de ácidos nucleicos o de proteínas, además presenta algunas ventajas frente a otras técnicas, como visualización directa del material estudiado, análisis en tiempo real del experimento, realización de ensayos en líquido, uso de moléculas de ácidos nucleicos de gran tamaño y observación de su conformación (Jalili y Laxminarayana, 2004). En AFM se han realizado menos estudios con RNA de hebra simple (ssRNA) en comparación al DNA, las causas de esto son atribuidas en gran medida a la mayor dificultad en analizar las muestras debido a las conformaciones adoptadas por el ssRNA, los inconvenientes al momento de fijar el ssRNA en la mica y las precauciones que se deben tomar para evitar su degradación (Hansma y col., 2003).

En relación a la adsorción del ssRNA en la mica, se tuvieron en cuenta los estudios previos con DNA, en donde la adición de cationes divalentes a la muestra permitió una fijación del ácido nucleico a la mica (Bustamante y Rivetti, 1996).

En los ensayos de VP1 con el transcrito del gen 8 truncado en el 5' (~205 nucleótidos), se observó la unión de la proteína al extremo 3' del ssRNA. Previos estudios para determinar las señales de reconocimiento, en el extremo 3' del ssRNA templado por la polimerasa VP1 (Tortorici y col., 2003; Lu y col., 2008), dan respaldo a estos resultados.

Aunque la secuencia consenso presente en el extremo 3' (3'CS) de todos los 11 ssRNA templados del rotavirus, hace pensar en que esta secuencia primaria contiene las señales de reconocimiento para la encapsidación y replicación del genoma del rotavirus (Patton y col., 2006b). Se sabe que las señales de reconocimiento para la polimerasa viral, se ubican no solo en parte de la secuencia consenso 3' sino en regiones previas al extremo 3' (Tortorici y col., 2003). Por otro lado las mutaciones realizadas en la secuencia consenso 3' del ssRNA templado, tiene un efecto en la replicación del genoma viral pero no en el reconocimiento de VP1 al ssRNA, esto se debe a la diferencia entre las señales de reconocimiento y las de replicación encontradas en el ssRNA (Chen y col., 2001; Tortorici y col., 2003). Las hipótesis basadas en el hecho de que los 11 ssRNAs templados del rotavirus al diferir en secuencia y tamaño van a presentar una estructura secundaria particular, en la cual la señales de reconocimiento del extremo 3', estarían accesibles a la polimerasa viral o a las proteínas no estructurales NSP2/5 (Patton y Spencer, 2000; Patton y col., 2006b; Shatkin y col., 2008).

En lo concerniente a los ensayos de VP1 con la molécula completa del ssRNA templado del gen 8, se halló una estructura predominante la cual se nombró como forma de Y. La proteína VP1 se unió mayormente a determinados sitios del ssRNA en forma de Y definidos como brazos y bifurcación. La forma de Y del ssRNA estuvo presente también cuando sólo se depositó el ssRNA en la mica. El contraste de esta estructura en forma de Y del ssRNA del gen 8 con la estructura secundaria predicha para dicho ssRNA (+), permitió entender en parte el por qué VP1 se unió a estos sitios del ssRNA.

Al menos en uno de los brazos del ssRNA en forma de Y se encuentran las secuencias consenso 5' y 3' (figura 11), en donde la interacción de estas secuencias consenso, ha sido predicha en la estructura secundaria de los ssRNA templados del gen 11 y 5 del rotavirus (Patton y col., 2000; Patton y col., 2003; Tortorici y col., 2006). Se ha postulado que la interacción entre las secuencias consenso del extremo 5' y 3', contribuye a estabilizar el ssRNA templado y permite la formación del llamado "panhandle", esta estructura hace más estable y accesible las señales de reconocimiento de la secuencia consenso 3' por la polimerasa viral (Patton y Spencer, 2000; Tortorici y col., 2006). En virus con genomas de RNA de polaridad positiva, la proximidad de los extremos 5' y 3' ocasiona que el complejo de replicación ("RC"), reconozca el extremo 5' ssRNA templado e inicie la síntesis de RNA del extremo 3' (Gritsun y Gould, 2007). En el Hantavirus la proteína de nucleocápside interactúa con el "panhandle".

Esta proteína desenrolla las dos hebras del RNA que forman el “panhandle”, se mantiene unida al extremo 5’ del ssRNA pero liberando el 3’, para favorecer la interacción de éste extremo con el complejo de replicación (Mir y Panganiban, 2006). En el virus sincicial el “panhandle”, contiene las señales de encapsidación, replicación y transcripción viral (Gritsun y Gould, 2007).

De acuerdo a los resultados obtenidos, VP1 se pudo unir no solo a la punta de los brazos (ubicación de la interacción entre las regiones consenso 5’ y 3’ del ssRNA) también a regiones cercanas del brazo y a la bifurcación, en lo cual las regiones en el ssRNA reconocidas por VP1 comprende regiones no conservadas en el ssRNA.

¿Ahora por qué la polimerasa apareció unida a la región definida como “cuerpo”? en este caso existe la posibilidad que estos sitios de unión en el ssRNA no sean tan prioritarios para VP1, pero si para otras proteínas involucradas en la morfogénesis del virus, en especial NSP2/NSP5. De igual manera no se descarta que las regiones del ssRNA del cuerpo o del brazo (donde se espera no estén las secuencias consenso 5’ y 3’), sean igual de importantes para VP1 y la interacción con proteínas del *core* o de proteínas no estructurales presentes en el viroplasma, induzca un cambio en la conformación del ssRNA permitiendo el traspaso de VP1 hacia regiones cercanas al extremo 3’.

Adicionalmente se realizó una mutación en el extremo 3’ (~200 nucleótidos), la cual comprometió la secuencia consenso 3’ y regiones no conservadas del 3’. En rigor la mutación afectó sitios del ssRNA donde se unió VP1 con bastante frecuencia (uno de los brazos del ssRNA forma de Y). Pero no se observó la interacción de VP1 con el ssRNA truncado en el 3’.

Estudios anteriores tampoco han encontrado una interacción entre VP1 y las secuencias del ssRNA pertenecientes al 5' (Tortorici y col., 2003). Mas bien un residuo conservado en la secuencia consenso 5' (5' CS), es esencial en la síntesis del dsRNA genómico del rotavirus (Tortorici y col., 2006). También es posible que VP1 reconozca señales en el 5', sólo cuando en el ssRNA templado hay una "ciclización" ocasionada por el apareamiento entre los extremos 5' y 3' del ssRNA, tal como se muestra en la estructura secundaria del ssRNA del gen 8.

En esta parte se abordan los resultados obtenidos en AFM, con los complejos de NSP2/NSP5 y el ssRNA templado.

Las proteínas NSP2 y NSP5 co-localizan en los viroplasmatas, estructuras donde se acumulan además de las proteínas involucradas en la morfogénesis viral, los ssRNA templados del rotavirus. La proteína NSP2 de acuerdo a sus funciones descritas (NTPasa, unión a ssRNA, actividad desestabilizadora de doble hélice, entre otras) se le atribuye un rol de motor molecular, en donde ayudaría a encapsidar el ssRNA templado en el core viral (Taraporewala y Patton., 2004). Hasta ahora la proteína NSP5 no tiene un función descrita en el ciclo replicativo del rotavirus, pero se sabe que es fosforilada durante la infección viral (Poncet y col., 1997).

Los complejos formados por las proteínas NSP2/NSP5, mostraron que solo un monómero del dímero de NSP5 interactúa con el octámero de NSP2. Mediante el uso de la criomicroscopía electrónica, se sabía de la unión de NSP5 a una región básica del octámero y este sitio de interacción se solapa con el ssRNA (Jiang y col., 2006).

En este estudio de criomicroscopía no se pudo determinar con certeza como se organizan los complejos de NSP2/NSP5 para formar los viroplasmias. En el caso de los ensayos de AFM con las proteínas NSP2/NSP5, es posible que los complejos observados puedan ser la base para el ensamblaje de los viroplasmias, en donde el monómero de NSP5 que no se une directamente al octámero, interactúe con otro complejo de NSP2-NSP5 o con otro octámero de NSP2.

En relación al modo de unión de NSP5 con el ssRNA templado, se evidenció la formación de agregados y la ausencia de la forma de Y adoptada por este ssRNA. La agregación quizás esté intrínsecamente asociada a la proteína NSP5, dada su participación en la construcción de los viroplasmias, sitios donde hay acumulación de proteínas con ssRNA. Por otro lado en los complejos de NSP5 con dsRNA genómico, no aparecieron complejos agregados. Más bien los monómeros de NSP5 se dispusieron de forma ordenada en la molécula de dsRNA. Algunos autores han postulado que la proteína NSP5 al unir el dsRNA, evita la activación de la proteína quinasa R (PKR) (Vende y col., 2002). La proteína PKR es una proteína inductora de la vía del interferón, la cual tiene un rol clave en la respuesta inmune innata en infecciones virales. La proteína PKR después de la unión a dsRNA, experimenta fosforilación en múltiples residuos de serina, treonina y tirosina (Lemaire y col., 2008). Un sustrato celular de la proteína PKR es la subunidad alfa del factor eucariótico 2 de iniciación ($eIF2\alpha$). Así la fosforilación del $eIF2\alpha$, inhibe la síntesis de proteínas en células infectadas con virus. La proteína NSP5 no contiene en su secuencia los motivos clásicos encontrados en PKR u otras proteínas que unen dsRNA (Vende y col., 2002).

La proteína VP6 del virus “bluetongue” BTV (perteneciente a la familia *Reoviridae*), es una fosfoproteína con afinidad por el ssRNA, dsRNA y DNA, pero a diferencia de NSP5, VP6 es una proteína básica del *core* del virión y tiene actividad helicasa (Roy, 2005), esta función tampoco ha sido encontrada en NSP5. Sin embargo no se descarta otra hipótesis mencionada por Vende y col., (2002), en la cual la afinidad de NSP5 sirva para “reclutar” a la proteína NSP2 (la cual posee actividad desestabilizadora de doble hélice), a sitios muy estructurados del ssRNA templado.

En relación a la unión de NSP2 con el ssRNA, los largos complejos formados de ssRNA con el octámero están asociados a su actividad desestabilizadora de doble hélice (Taraporewala y col., 2001). Esta actividad de NSP2 posiblemente evitó la aparición del ssRNA en forma de Y, en estos ensayos y en los complejos de NSP2/NSP5/ssRNA. La actividad desestabilizadora de doble hélice de NSP2 incluye la disrupción o separación de “dúplex” cortos de DNA-RNA y de RNA-RNA, esta función no es dependiente de Mg^{+} o de ATP, mas bien su mecanismo es similar a las proteínas δ NS de reovirus, NS2 de BTV y a la proteína SSBs (“single-stranded DNA binding proteins”). La proteína SSBs al unirse al ssDNA de manera cooperativa e inespecífica, desestabiliza la hélice y evita el apareamiento de bases complementarias en el proceso de replicación del DNA. La similitud en el funcionamiento de la proteína SSBs y NSP2, indican que NSP2 remueve las estructuras secundarias en el ssRNA templado las cuales pueden interferir con la encapsidación y replicación (Taraporewala y col., 2001).

Los complejos de NSP2/NSP5/ssRNA no evidenciaron una unión de las proteínas NSP2/NSP5 a un sitio determinado del ssRNA, ya que se formaron agregados de ssRNA proteínas. Este resultado puede deberse a varias causas como: i) la capacidad de ambas proteínas de formar los viroplasmos, los cuales como se ha mencionado acumulan proteínas y ssRNA; ii) la presencia de las dos proteínas implicó una desestabilización de la estructura en Y del ssRNA y este ssRNA se mantiene asociado a ambas proteínas para evitar su degradación o nuevo plegamiento; iii) los estudios de criomicroscopía electrónica evidencian que el ssRNA y NSP5, tienen el mismo sitio de unión al octámero de NSP2 (Jiang y col., 2006), posiblemente los complejos vistos sean intermediarios de esta reacción, en donde el ssRNA esté desplazando a NSP5 o viceversa.

En la figura 29 se muestra un modelo donde se resumen los resultados obtenidos en este trabajo.

En esta tesis se utilizó el AFM para estudiar proteínas involucradas en la morfogénesis del rotavirus y su interacción con el ssRNA templado. Aunque en su mayoría se pudo visualizar el material de interés, algunos estudios en donde se involucra la formación de grandes complejos tipo NSP2/NSP5/ssRNA, sería convenientes realizarlos en solución para determinar en tiempo real si se está dando una competencia entre NSP5 y el ssRNA por el mismo sitio en el octámero. También en estos ensayos en líquido no se descarta el uso de proteínas del *core* diferentes a VP1, porque puede dar mas información acerca del proceso de morfogénesis viral.

También se puede determinar con los otros ssRNA templados del rotavirus, en los cuales está predicha la estructura secundaria si se presenta una interacción similar entre VP1 con el ssRNA templado del gen 8.

Otro aspecto importante es optar por la técnica de SFM (“scanning force microscopy”), porque esta permite la cuantificación de las interacciones y si son específicas o no.

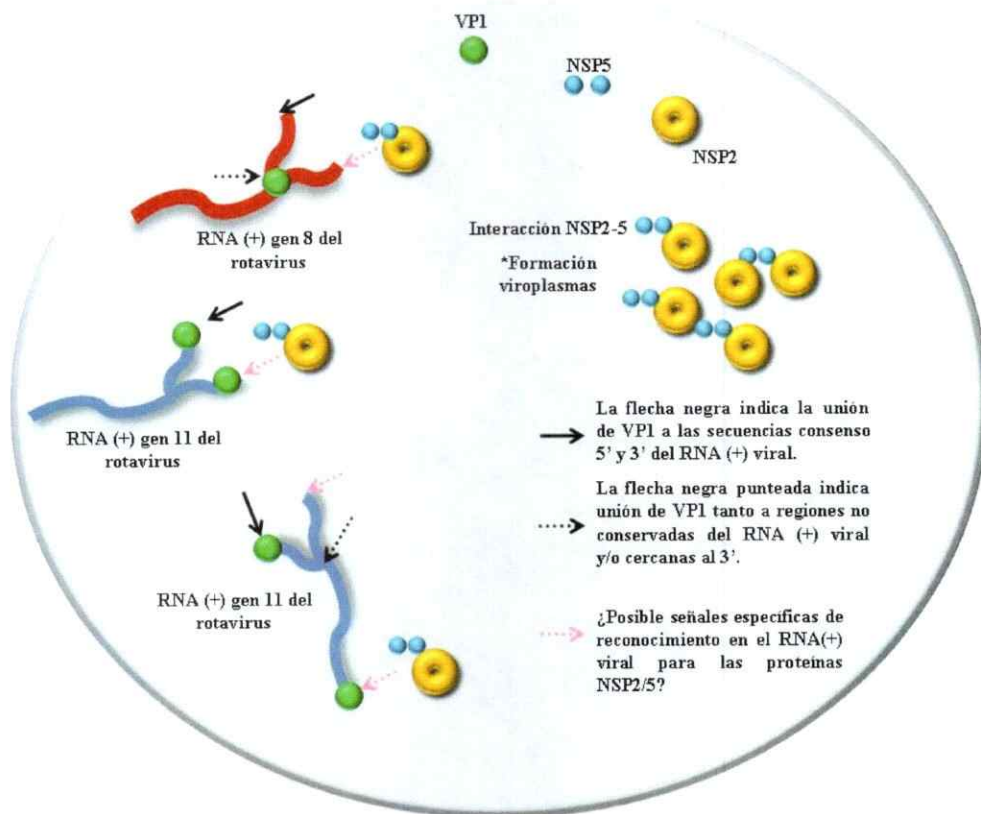


Figura 29. Modelo de los eventos iniciales en la morfogénesis del rotavirus.

Figura 29. Modelo de los eventos iniciales en la morfogénesis del rotavirus. En este modelo se consideran solo las proteínas VP1, NSP2 y NSP5 con el ssRNA templado. En este caso los ssRNA templados del gen 8 (color rojo) y 11 (color azul) se les atribuyó la misma estructura en forma de Y. La interacción de las proteínas NSP2/NSP5 origina los viroplasmos y su ensamblaje está mediado por el dímero de NSP5. Posterior a la formación de viroplasmos y de acuerdo a la presencia del ssRNA templado, se inicia la encapsidación y replicación del genoma viral. La proteína VP1 se une a regiones cercanas al 3' del ssRNA templado, lo cual concierne a secuencias consenso del extremo 3' del ssRNA como regiones no conservadas. La unión de NSP2/NSP5 al ssRNA templado tiene como fin desestabilizar los dúplex de RNA-RNA que impiden la encapsidación del ssRNA templado. i) La interacción de NSP2 y NSP5 con VP1 puede facilitar su unión a determinados sitios del ssRNA ii) NSP2/NSP5 reconoce secuencias plegadas particulares para cada uno de los ssRNA templados.

CONCLUSIONES

- La proteína recombinante VP1 obtenida en este estudio, tiene la capacidad de unirse a un ssRNA templado truncado en el 5', esto se debe a las señales de reconocimiento y a la secuencia consenso presentes en el extremo 3' del ssRNA.
- La molécula completa del ssRNA templado del rotavirus, al ser adsorbido en la mica adopta en su mayoría una forma de Y, esta particularidad es atribuible a la estructura secundaria energéticamente mas estable, reportada para el ssRNA correspondiente al gen 8 del rotavirus.
- Se observó a la proteína VP1 unida con mayor frecuencia, a sitios en el ssRNA templado en forma de Y, nombrados como "brazos" y "bifurcación". Esto se explica porque al menos en uno de los "brazos" del ssRNA en forma de Y, se localizan señales de reconocimiento del 3' y/o las secuencias consenso 5' y 3.
- En los complejos formados por las proteínas NSP2 y NSP5, sólo un monómero del dímero de NSP5 se une al octámero de NSP2. La disposición del complejo NSP2/NSP5 puede sugerir la base del ensamblaje de los viroplasma, porque el monómero de NSP5 que no interacciona directamente con NSP2, se uniría con otro complejo NSP2/NSP5 y/o NSP2.
- En los complejos de NSP2/NSP5/ssRNA, dada la formación de agregados, no hubo evidencia si el complejo NSP2/NSP5 se une a sitios determinados en el ssRNA en forma de Y.

Se proponen alternativas como ensayos de AFM en solución o SFM, para determinar con certeza los sitios de unión de estas proteínas al ssRNA templado y si la formación de agregados en estos complejos es o no intrínseco a ellos.

- El modo de unión de las proteínas NSP5 y NSP2 al ssRNA templado, se relaciona con funciones previamente descritas, en donde NSP2 se acomplejó a lo largo del ssRNA esto corresponde con su actividad desestabilizadora de doble hélice, mientras la proteína NSP5 formó agregados con el ssRNA, lo cual se asocia a los viroplasmos.

BIBLIOGRAFÍA

- Afrikanova, I., Miozzo, M., Giambiagi, S., Burrone, O. (1996). Phosphorylation generates different forms of rotavirus NSP5. *J. Gen. Virol.* 77: 2059–2065.
- Afrikanova, I., Fabbretti, E., Miozzo, M.C., and Burrone, O.R. (1998). Rotavirus NSP5 phosphorylation is up-regulated by interaction with NSP2. *J. Gen. Virol.* 79:2679-2686.
- Alvarez, D., Lodeiro, M., Ludueña, S., Pietresanta, L., Gamarnik, A. (2005). Long-Range RNA-RNA interactions circularize the Dengue virus genome. *J. Virol.* 79:6631-6643.
- Angel, J., Franco, M., and Greenberg, H. (2007). Rotavirus vaccines: recent developments and future considerations. *Nature.* 5:529-540.
- Aponte, C., Poncet, D., and Cohen, J. (1996). Recovery and characterization of a replicase complex in rotavirus-infected cells by using a monoclonal antibody against NSP2. *J. Virol.* 70:985–991.
- Arnoldi, F., Campagna, M., Eichwald, C., Desselberger, U., and Burrone, O.R. (2007). Interaction of rotavirus polymerase VP1 with nonstructural protein NSP5 is stronger than that with NSP2. *J. Virol.* 81, 2128–2137.
- Arvin, A., and Greenberg, H. (2006). New viral vaccines. *Virology.* 344:240-249.
- Bar-Magen, T., Spencer, E., and Patton J. T. (2007). An ATPase associated with the rotavirus phosphoprotein NSP5. *Virology* 369:389-399.
- Benureau, Y., Huet, J.C., Charpilienne, A., Poncet, D., and Cohen, J. (2005). Trypsin is associated with the rotavirus capsid and is activated by solubilization of outer capsid proteins. *J. Gen. Virol.* 86:3143-3151.
- Berois, M., Sapin, C., Erk, I., Poncet, D., and Cohen, J. (2003). Rotavirus nonstructural protein NSP5 interacts with major core protein VP2. *J. Virol.* 77:1757-1763.
- Binnig, G., Quate, C. F., and Gerber, Ch. (1986). Atomic Force Microscopy. *Phys. Rev. Lett.* 56:930-933.
- Boyce, M., Wehrfritz, J., Noad, R., and Roy, P. (2004). Purified recombinant bluetongue virus VP1 exhibits RNA replicase activity. *J. Virol.* 78:3994-4002.
- Bressanelli, S., Tomei, L., Roussel, A., Incitti, L., Vitale, R., Mathieu, M., De Francesco, R. and Rey, F.A. (1999). Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C. *Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 13304-13309.

- Buck, K.W.** (1999) Replication of tobacco mosaic virus RNA. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 354:613-627.
- Bustamante, C. and Rivetti, C.** (1996). Visualizing protein-nucleic acid interactions on a large scale with the scanning force microscopy. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 25:395-429.
- Butcher, S.J., Grimes, J.M., Makeyev, E.V., Bamford, D. H and Stuart, D.I.** (2001). A mechanism for initiation RNA-dependent RNA polymerization. *Nature* 410,235-40.
- Campagna, M., Budini, M., Arnoldi, F., Desselberger, U., Allende, J., and Burrone, O.** (2007). Impaired hyperphosphorylation fo rotavirus NSP5 in cells depleted of casein kinase 1 α is associated with the formation of viroplasm with altered morphology and a moderate decrease in virus replication. *J. Gen. Virol.* 88:2800-2810.
- Campagna, M., Eichwald, C., Vascotto, F., and Burrone, O. R.** (2005). RNA interference of rotavirus segment 11 mRNA reveals the essential role of NSP5 in the virus replicative cycle. *J. Gen. Virol.* 8: 1481-1487.
- Chen, D., Gombold, J.L., and Ramig, R.F.** (1990). Intracellular RNA synthesis directed by temperature-sensitive mutants of simian rotavirus SA11. *Virology.* 178:143-151.
- Chen, D., and Patton, J. T.** (1998). Rotavirus RNA replication requires a single-stranded 3' end for efficient minus-strand synthesis. *J. Virol.* 72:7387-7396.
- Chen, D., Barros, M., Spencer, E., and Patton, J. T.** (2001). Features of the 3'-consensus sequence of rotavirus mRNAs critical to minus strand synthesis. *Virology* 282:221-229.
- Chen, D., Luongo, C.L., Nibert, M.L., and Patton, J.T.** (1999). Rotavirus open cores catalyze 5'-capping and methylation of exogenous RNA: evidence that VP3 is a methyl-transferase. *Virology.* 265:120-130.
- Chen, D., Zeng, C. Q., Wentz, M. J., Gorziglia, M., Estes, M. K., and Ramig, R. F.** (1994). Template-dependent, in vitro replication of rotavirus RNA. *J. Virol.* 68 :7030-7039.
- Choi, K.H., Groarke, J.M., Young, D.C., Kuhn, R.J., Smith, J.L., Pevear, D.C., and Rossmann, M.G.** (2004). The structure of the RNA-dependent RNA polymerase from bovine viral diarrhea virus establishes the role of GTP in of *novo* initiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101: 4425-4430.

- Cohen, J., Laporte, J., Charpilienne, A., and Scherrer, R. (1979). Activation of rotavirus RNA polymerase by calcium chelation. *Arch. Virol.* 60:177-186.
- Coulson, B.S., Londrigan, S.L., and Lee, D.J. (1997). Rotavirus contains integrin ligand sequences and a disintegrin-like domain that are implicated in virus entry into cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:5389-5394.
- Desselberger, U., Manktelow, E., Li, W., Cheung, W., Iturriza-Gómara, M., and Gray, J. (2009). Rotavirus and rotavirus vaccines. *British Medical Bulletin.* 90:37-51
- Dormitzer, P.R., Nason, E.B., Prasad, B.V., and Harrison, S.C. (2004). Structural rearrangements in the membrane penetration protein of a non-enveloped virus. *Nature.* 430:1053-1058.
- Dormitzer, P.R., Sun, Z.Y., Blixt, O., Paulson, J.C, Wagner, G., and Harrison, S.C. (2002). Specificity and affinity of sialic acid binding by the rhesus rotavirus VP8* core. *J. Virol.* 76:10512-10517.
- Dufrêne, Y.F. (2003). Recent progress in the application of atomic force microscopy imaging and force spectroscopy to microbiology. *Curr. Opin. Microbiol.* 6:317-323.
- Drygin, Y., Bordunova, O., Gallyamov, M., and Yaminsky, I. (1998). Atomic force microscopy examination of tobacco mosaic virus and virion RNA. *FEBS Letters* 425:217-221.
- Eichwald, C., Jacob, G., Muszynski, B., Allende, J.E., and Burrone, O.R. (2004a). Uncoupling substrate and activation functions of rotavirus NSP5: Phosphorylation of Ser-67 by casein kinase 1 is essential for hyperphosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101: 16304-16309.
- Eichwald, C., Rodriguez, J.F., and Burrone, O.R. (2004b). Characterization of rotavirus NSP2/NSP5 interactions and the dynamics of viroplasm formation. *J. Gen. Virol.* 85:625-634.
- Eichwald, C., Vascotto, F., Fabbretti, E., and Burrone, O.R. (2002). Rotavirus NSP5: mapping Phosphorylation sites and kinase activation and viroplasm localization domains. *J. Virol.* 76:3461-3470.
- Estes, M.K. (2001). Rotaviruses and their replication, In: Knipe D., Howley M., et al. (Eds.), *Fields Virology*, 4th edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA. 1747-1785.
- Estes, M.K., and Kapikian, A.Z. (2007). In *Fields Virology*. D. Knipe and P. Howley, eds. (Philadelphia, PA, Lippincott Williams & Wilkins) pp. 1917-1974.

-Fabbretti, E., Afrikanova, I., Vascotto, F., and Burrone, O. (1999). Two non-structural rotavirus proteins, NSP2 and NSP5, form viroplasm-like structures in vivo. *J. Gen. Virol.* 80, 333–339.

-Frilander, M., Gottlieb, P., Strassman, J., Bamford, D.H. and Mindich, L. (1992) Dependence of minus strand synthesis on complete genomic packaging in the double stranded RNA bacteriophage phi 6. *J. Virol.* 66:5013-5017.

-Gallegos, C.O. and Patton, J.T. (1989). Characterization of rotavirus replication intermediates: a model for the assembly of single-shelled particles. *Virology*, 172, 616-27.

-Glass, R., Parashar, U., Bresee, J., Turcios, R., Fischer, T., Widdowson, M., Jiang, B., and Gentsch, J. (2006). Rotavirus vaccines: current prospects and future challenges. *Lancet.* 368:323-332.

-Gonzalez, R., Espinosa, R., Romero, P., Lopez, S., and Arias, C. (2000). Relative localization of viroplasmic and endoplasmic reticulum-resident rotavirus proteins in infected cells. *Arch. Virol.* 145:1963–1973.

-Gonzalez, S., and Burrone, O. (1991). Rotavirus NS26 is modified by addition of single O-linked residues of N-acetylglucosamine. *Virology* 182: 8–16.

-Gonzalez, R.A., Torres-Vega, M.A., Lopez, S., and Arias, C.F. (1998). In vivo interactions among rotavirus nonstructural proteins. *Arch. Virol.* 143:981-996.

-Gottlieb, P., Qiao, X., Strassman, J., Frilander, M. and Mindich, L. (1994) Identification of the packaging regions within the genomic RNA segments of bacteriophage phi 6. *Virology.*200:42-47.

-Grimes, J.M., Burroughs, J.N., Gouet, P., Diprose, J.M., Malby, R., Zientara, S., Mertens, P.P., and Stuart, D.I. (1998). The atomic structure of the bluetongue virus core. *Nature.* 395:470-478.

-Grimes, J.M., Jakana, J., Ghosh, M., Basak, A.K., Roy, P., Chiu, W., Stuart, D.I., and Prasad, B.V. (1997). An atomic model of the outer layer of the bluetongue virus core derived from X-ray crystallography and electron cryomicroscopy. *Structure.* 5: 885-893.

-Gritsun, T.S., and Gould, E.A. (2007). Origen and evolution of Flavivirus 5'UTRs and panhandles: Trans-terminal duplications? *Virology.* 366: 8-15.

-Guerrero, C.A., Méndez, E., Zárata, S., Isa, P., López, S., and Arias, C.F. (2000). Integrin alpha(v)beta(3) mediates rotavirus cell entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 14644-14649

- Hamon, L., Pastré, D., Dupaigne, P., Le Breton, C., Le Cam, E., and Piétrement, O. (2007). High-resolution AFM imaging of single-stranded DNA-binding (SSB) protein-DNA complexes. *Nucl. Acids Res.* **35**(8): e58.
- Hansma, H.G., and Hoh, J.H. (1994). Biomolecular imaging with the atomic force microscope. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **23**:115-139.
- Hansma, H.G., Oroudjev, E., Baudrey, S., and Jaeger, L. (2003). Tecto RNA and "kissing-loop" RNA: atomic force microscopy of self-assembling RNA structures. *J. Microsc.* **212**: 272-279.
- Hansma, H.G., Revenko, I., Kim, K., and Laney, D.E. (1996). Atomic force microscopy of long and short double-stranded single-stranded and triple-stranded nucleic acids. *Nucl. Acids. Res.* **24**: 713-720.
- Helmberger-Jones, M., and Patton, J.T. (1986). Characterization of subviral particles in cells infected with simian rotavirus SA11. *Virology.* **155**:655-665.
- Henn, A., Medalia, O., Shi, S., Steinberg, M., Franceschi, F., and Sagi, I. (2001). Visualization of unwinding activity of duplex RNA by DbpA, a DEAD box helicase, at single-molecule resolution by atomic force microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:5007-12.
- Heymann, J.B., Möller, C. and Müller, D.J. (2002). Sampling effects influence heights measured with atomic force microscopy. *J. Microsc.* **207**:43-51.
- Isa, P., López, S., Segovia, L., and Arias C.F. (1997). Functional and structural analysis of the sialic acid-binding domain of rotavirus. *J. Virol.* **71**:6749:6756.
- Jacobo-Molina, A., Ding, J., Nanni, R., Clark, A., Lu, X., Tantillo, C., Williams, R., Kamer, G., Ferris, A., Clark, P., Hizi, A., Hughes, S., and Arnold, E. (1993). Crystal structure of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase complexed with double-stranded DNA at 3.0 Å resolution shows bent DNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **90**, 6320-6324.
- Jalili, N. and Laxminarayana, K. (2004). A review of atomic force microscopy imaging systems: application to molecular metrology and biological sciences. *Mechatronics.* **14**:907-945.
- Jayaram, H., Estes, M.K., and Prasad, B.V. (2004). Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. *Virus Res.* **101**:67-81.
- Jayaram, H., Taraporewala, Z., Patton, J. T., and Prasad, B. V. (2002). Rotavirus protein involved in genome replication and packaging exhibits a HIT-like fold. *Nature* **417**:311-315.

- Jiang, X., Jayaram, H., Kumar, M., Ludtke, S. J., Estes, M. K., Prasad, B. V. V.** (2006). Cryoelectron Microscopy Structures of Rotavirus NSP2-NSP5 and NSP2-RNA Complexes: Implications for Genome Replication. *J. Virol.* 80: 10829-10835.
- Joyce, C.M. and Steitz, T.A.** (1995). Polymerase structures and function: variations on a theme? *J. Bacteriol.* 177: 6321-6329.
- Juuti, J.T., Bamford, D.H., Tuma, R., and Thomas, G.J., Jr.** (1998). Structure and NTPase activity of the RNA-translocating protein (p4) of bacteriophage phi6. *J. Mol. Biol.* 279:347-359.
- Kainov, D.E., Butcher, S.J., Bamford, D.H., and Tuma, R.** (2003). Conserved intermediates on the assembly pathway of double-stranded RNA bacteriophages. *J. Mol. Biol.* 328:791-804.
- Kainov, D.E., Tuma, R., and Mancini, E.J.** (2006). Hexameric molecular motors: P4 packaging ATPase unravels the mechanism. *Cell. Mol. Life. Sci.* 63:1095-1105.
- Kasas, S. and Dietler, G.** (2008). Probing nanomechanical properties from biomolecules to living cells. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 456:13-27.
- Kapikian, A. Z., Y. Hoshino, R. M. Chanock, and I. Perez-Schael.** (1996). Efficacy of a quadrivalent rhesus rotavirus-based human rotavirus vaccine aimed at preventing severe rotavirus diarrhea in infants and young children. *J. Infect. Dis.* 174(Suppl. 1):S65-S72
- Kattoura, M. D., Chen, X., and Patton, J. T.** (1994). The rotavirus RNA-binding protein NS35 (NSP2) forms 10S multimers and interacts with the viral RNA polymerase. *Virology.* 202:803-813.
- Kattoura, M. D., Clapp, L. L., and Patton, J. T.** (1992). The rotavirus nonstructural protein, NS35, possesses RNA-binding activity in vitro and in vivo. *Virology.* 191:698-708.
- Kiselyova, O., Yaminsky, I., Ivanov, Y., Kanaeva, I., Kuznetsov, V., and Archakov, A.** (1999). Study of membrane proteins, cytochrome P450 2B4, and NADPH-cytochrome P450 reductase and their complex formation. *Arch. Biochem. Biophys.* 371: 1-7.
- Kiselyova, O.I., and Yaminsky, I.V.** (2003). Atomic Force Microscopy of Protein Complexes. In the Methods in Molecular Biology series, vol. 242: Atomic Force Microscopy Biomedical Methods and Applications, P.C. Braga and D. Ricci (eds). Humana Press, Totowa, New York, pp. 217-230.

- Kohlstaedt, L.A., Wang, J., Friedman, J.M., Rice, P.A. and Steitz, T.A. (1992). Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science* 256:1783-1790.
- Komoto, S., Sasaki, J., and Taniguchi, K. (2006). Reverse genetics system for introduction of site-specific mutations into the double-stranded RNA genome of infectious rotavirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:4646-4651.
- Kumar, M., Jayaram, H., Vasquez-Del Carpio, R., Jiang, X., Taraporewala, Z. F., Jacobson, R. H., Patton, J. T., and Prasad, B. V. V. (2007). Crystallographic and Biochemical Analysis of Rotavirus NSP2 with Nucleotides Reveals a Nucleoside Diphosphate Kinase-Like Activity. *J. Virol.* 81: 12272-12284.
- Labbe, M., Charpilienne, A., Crawford, S.E., Estes, M.K., and Cohen, J. (1991). Expression of rotavirus VP2 produces empty core like particles. *J. Virol.* 65:2946-2952.
- Lawton, J. A., Estes, M. K., and Prasad, B. V. (2000). Mechanism of genome transcription in segmented dsRNA viruses. *Adv. Virus Res.* 55:185-229.
- Lawton, J.A., Estes, M.K., and Prasad, B.V. (1997a). Three-dimensional visualization of mRNA release from actively transcribing rotavirus particles. *Nat. Struct. Biol.* 4:118-121.
- Lawton, J.A., Zeng, C.Q., Mukherjee, S.K., Cohen, J., Estes, M.K., and 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. *J. Virol.* 71:7353-7360.
- Lemaire, P., Anderson, E., Lary, J., and Cole, J. (2008). Mechanism of PKR Activation by dsRNA. *J. Mol. Biol.* 381: 351-360.
- Liemann, S., Chandran, K., Baker, T.S., Nibert, M.L., and Harrison, S.C. (2002). Structure of the reovirus membrane-penetration protein, Mu1, in a complex with its protector protein, Sigma3. *Cell.* 108: 283-295.
- Liu, M., Mattion, N.M, and Estes, M.K. (1992). Rotavirus VP3 expressed in insect cells possesses guanylyltransferase activity. *Virology.* 188:77-84.
- López, S. and Arias, C.F. (2004). Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. *Trends Microbiol.* 12: 271-278.
- López, S. and Arias, C.F. (2006). Early Steps in Rotavirus Cell Entry. *Curr. Topics in Microb. and Immun.* 309:39-66.

- Lu, X., Mc Donald, S., Tortorici, M.A., Tao, Y., Vasquez-Del Carpio, R., Nibert, M., Patton, J.T. and Harrison, S. (2008). Mechanism for coordinated RNA packaging and genome replication by rotavirus polymerase VP1. *Structure* 16:1678-1688.
- Lymperopoulos, K., Noad, R., Tosi, S., Nethisinghe, S., Brierley, I., and Roy, P. (2006). Specific binding of Bluetongue virus NS2 to different viral plus-strand RNAs. *Virology*. 353: 17-26.
- Lymperopoulos, K., Wirblich, C., Brierley, I., and Roy, P. (2003). Sequence Specificity in the Interaction of Bluetongue Virus Non-structural Protein 2 (NS2) with Viral RNA. *J. Biol. Chem.* 278 : 31722-31730.
- Mc Donald, S., Aguayo, D., Gonzalez-Nilo, F. and Patton, J. T. (2009). Shared and Group-Specificity Features of the Rotavirus RNA Polymerase Reveal Potential Determinants of Gene Reassortment Restriction. *J. Virol.* 83:6135-6148.
- Mathieu, M., Petitpas, I., Navaza, J., Lepault, J., Kohli, E., Pothier, P., Prasad, B.V., Cohen, J., and Rey, F.A. (2001). Atomic structure of the major capsid protein of rotavirus: implications for the architecture of the virion. *EMBO J.* 20: 1485-1497.
- Matthinjssens, J., Ciarlet, M., Rahman, M., Attoui, H., Banyai, K., Estes, M.K., Gentsch, J., Iturriza-Gómara, M., Kirkwood, C., Martella, V., Mertens, P., Nakagomi, O., Patton, J., Ruggeri, F., Saif, L., Santos, N., Steyer, A., Taniguchi, K., Desselberger, U., and Van Ranst, M. (2008). Recommendations for the classification of group A rotavirus using all 11 genomic RNA segments. *Arch. Virol.* 153: 1621-1629.
- Mir, M.A., and Panganiban, A.T. 2006. The bunyavirus nucleocapsid Protein is an RNA chaperone: possible roles in viral RNA panhandle formation and genome replication. *RNA*. 12: 272-282.
- Mitchel, D.B. and Both, G.W. (1990). Completion of the genomic sequence of the simian rotavirus SA11: Nucleotide sequences of segments 1, 2 and 3. *Virology* 177: 324-331.
- Mohan, K.V., Muller, J., Som, I., and Atreya, C.D. (2004). The N- and C-terminal regions of rotavirus NSP5 are the critical determinants for the formation of viroplasm-like structures independent of NSP2. *J. Virol.* 77:12184-12192.
- Murphy, T., Garguillo, P., Massoudi, M., Nelson, D., Jumaan, A., Okoro, C., Zanardi, L., Setia, S., Fair, E., LeBaron, E., Wharton, M., and Livingood, J. (2001) Intussusception among infants given an oral rotavirus vaccine. *N. Engl. J. Med.* 344: 564-572.

- Oberleithner H., Schneider, S., and Bustamante, J.O. (1996) Atomic force microscopy visualizes ATP-dependent dissociation of multimeric TATA-binding protein before translocation into the cell nucleus. *Pflügers Arch.* 432:839-844
- Parashar, U., Hummelman, E., Bresee, J., Miller, M., and Glass, R. (2003). Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg. Infect. Dis.* 9:565-571.
- Patton, J.T., and Gallegos, C.O. (1988). Structure and protein composition of the rotavirus replicase particle. *Virology.* 166:358-365.
- Patton, J. T. (1996). Rotavirus VP1 alone specifically binds to the 3' end of viral mRNA, but the interaction is not sufficient to initiate minus-strand synthesis. *J. Virol.* 70, 7940-7.
- Patton, J. T., Jones, M. T., Kalbach, A. N., He, Y. W., and Xiaobo, J. (1997). Rotavirus RNA polymerase requires the core shell protein to synthesize the double-stranded RNA genome. *J. Virol.* 71:9618-9626.
- Patton, J.T., Kerney, K. and Taraporewala, Z. (2003). Rotavirus genome replication: role of the RNA-binding proteins. In *Viral Gastroenteritis*, Desselberger, U. and Gray, J. (eds). Elseviers Science B.V., pp. 165-183.
- Patton, J.T., Silvestri, L.S., Tortorici, M.A., Vasquez-Del Carpio, R., and Taraporewala, Z.F. (2006a). Rotavirus Genome Replication and Morphogenesis: Role of the Viroplasm. *CTMI* 309:169-187.
- Patton, J. T., Vasquez-Del Carpio, R., Tortorici, M.A., and Taraporewala, Z. (2006b). Coupling of Rotavirus genome replication and capsid assembly. *Adv. Virus. Res.* 69:167-201.
- Patton, J. T., Wentz, M., Xiaobo, J., and Ramig, R. F. (1996). cis-Acting signals that promote genome replication in rotavirus mRNA. *J. Virol.* 70:3961-3971.
- Patton, J.T. and Spencer, E. (2000). Genome replication and packaging of segmented double-stranded RNA viruses. *Virology* 277: 217-225.
- Patton, J.T. (2001). Rotavirus RNA replication and gene expression. *Novartis Found Symp.* 238, 64-77.
- Patton, J.T., Chnaiderman, J., and Spencer, E. (1999). Open reading frame in rotavirus mRNA specifically promotes synthesis of double-stranded RNA: Template size also affects replication efficiency. *Virology* 264: 167-180.
- Parot, P., Dufrêne, Y., Hinterdorfer, P., Le Grimelle, C., Navajas, D., Pelleper, J.L. and Scheuring, S. (2007). Past, present and future of atomic force microscopy in life sciences and medicine. *J. Mol. Recognit.* 20: 418-431.

- Pérez-Vargas, J., Pavel, I., López, S., and Arias, C. (2006). Rotavirus vaccine: early introduction in Latin America-risks and benefits. *Arch. Med. Res.* 37:1-10.
- Pesavento, J.B., Crawford, S.E., Estes, M.K., and Prasad, B.V. (2006). Rotavirus proteins: structure and assembly. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 309:189-219.
- Petrie, B., D., Grahan, H., Hanssen and M.K. Estes. (1982). Localization of rotavirus antigens in infected cells by ultrastructural immunocytochemistry. *J. Gen. Virol.* 63:457-467.
- Petrie, B. L., Greenberg, H. B., Graham, D. Y., and Estes, M. K. (1984). Ultrastructural localization of rotavirus antigens using colloidal gold. *Virus Res.* 1:133-152.
- Poncet, D., Lindenbaum, P., L'Haridon, R., and Cohen, J. (1997). In vivo and in vitro Phosphorylation of rotavirus NSP5 correlates with its localization in viroplasms. *J. Virol.* 71:34-41.
- Poranen, M. and Tuma, R. (2004). Self-assembly of double-stranded RNA bacteriophages. *Virus Res.* 101:93-100.
- Prasad, B., Wang, G., Clerx, J., and Chiu, W. (1988). Three-dimensional structure of rotavirus. *J. Mol. Biol.* 199, 269-275.
- Prasad, B.V., and Prevelige, P.E. (2003). Viral genome organization. *Adv. Protein. Chem.* 64:219-258.
- Prasad, B.V., Rothnagel, R., Zeng, C. Q., Jakana, J., Lawton, J. A., Chiu, W. and Estes, M. K. (1996). Visualization of ordered genomic RNA and localization of transcriptional complexes in rotavirus. *Nature* 382, 471-3.
- Prasad, BV., Burns, J.W., Marietta, E., Estes, M.K., and Chiu W. (1990). Localization of VP4 neutralization sites in rotavirus by three-dimensional cry-electron microscopy. *Nature.* 343: 476-479.
- Ramig, R.F., and Petrie, B.L. (1984). Characterization of temperature-sensitive mutants of simian rotavirus SA11: protein synthesis and morphogenesis. *J. Virol.* 49:665-673.
- Rahman, M., Yang, X., Sun, H., Mahzebin, K., Verstappen, N., Novo, L., Matthijssens, J., and Ranst, M. (2008). Emerging G9 rotavirus strains in the northwest of China. *Virus Res.* 13:157-162.

- Roy, Polly. (2005). Bluetongue virus proteins and particles and their role in virus entry, assembly and release. *Adv. Virus. Res.* 64: 69-123.
- Sen, A., Agresti, D., and Mackow, E. (2006). Hyperphosphorylation of the Rotavirus NSP5 Protein Is Independent of Serine 67 or NSP2, and the Intrinsic Insolubility of NSP5 Is Regulated by Cellular Phosphatases. *J. Virol.* 80:1807-1816.
- Shatkin, A., Das, K., and Arnold, E. (2008). 3D jigsaw puzzle in rotavirus assembly. *Structure.* 16:1601-1602.
- Shaw, A.L., Rothnagel, R., Zeng, C.Q., Lawton, J.A., Ramig, R.F., Estes, M.K., and Prasad, B.V. (1996). Rotavirus structure: interactions between the structural proteins. *Arch. Virol. Suppl.* 12:21-27.
- Silvestri, L.S., Taraporewala, Z.F., and Patton, J.T. (2004). Rotavirus replication: plus-sense templates for double-stranded RNA synthesis are made in viroplasms. *J. Virol.* 78, 7763-7774.
- Schuck, P., Taraporewala, Z., McPhie, P., and Patton, J.T. (2001). Rotavirus nonstructural protein NSP2 self-assembles into octamers that undergo ligand-induced conformational changes. *J. Biol. Chem.* 276:9679-9687.
- Starnes, M.C., and Joklik, W.K. (1993). Reovirus protein lambda 3 is a poly(C)-dependent poly (G) polymerase. *Virology.* 39, 822-831.
- Tao, Y., Farsetta, D.L., Nibert, M.L. and Harrison, S.C. (2002). RNA synthesis in a cage-structural studies of reovirus polymerase. *Cell.* 111: 733-745.
- Taraporewala, Z., Chen, D., and Patton, J. T. (2001). Multimers of the Bluetongue Virus Nonstructural Protein, NS2, Possess Nucleotidyl Phosphatase Activity: Similarities between NS2 Rotavirus NSP2. *Virology.* 280: 221-231.
- Taraporewala, Z. F., and Patton, J. T. (2001). Identification and characterization of the helix-destabilizing activity of rotavirus nonstructural protein NSP2. *J. Virol.* 75 :4519-4527.
- Taraporewala, Z., Chen, D., and Patton, J. T. (1999). Multimers formed by the rotavirus nonstructural protein NSP2 bind to RNA and have nucleoside triphosphatase activity. *J. Virol.* 73:9934-9943.
- Taraporewala, Z., and Patton, J.T. (2004). Nonstructural proteins involved in genome packaging and replication of rotaviruses and other members of the Reoviridae. *Virus Res.* 101, 57-66.

- Taraporewala, Z.F., Jiang, X., Vasquez-Del Carpio, R., Jayaram, H., Prasad, B.V., and Patton, J.T. (2006). Structure-function analysis of rotavirus NSP2 octamer by using a novel complementation system. *J. Virol.* 80:7984-7994.
- Taraporewala, Z., Kumar, M., Prasad, B.V. and Patton, J. T. (2008) Structure and Function of the Rotavirus NSP2 Octamer, an essential Component of the Viroplasm. In Segmented Double-Stranded RNA Viruses, Patton J.T. (eds.), Caister Academic Press, Norfolk, U.K. 273-291.
- Taylor, J.A., O'Brien, J.A., and 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. *EMBO J.* 15: 4469-4476.
- Tortorici, M. A., Broering, T. J., Nibert, M. L. and Patton, J. T. (2003). Template recognition and formation of initiation complexes by the replicase of a segmented double-stranded RNA virus. *J. Biol. Chem.* 278, 32673-82.
- Tortorici, M.A., Shapiro, B., Patton, J.T. (2006). A base-specific recognition signal in the 5' consensus sequence of rotavirus plus-strand RNAs promotes replication of the double-stranded RNA genome segments. *RNA.* 12:133-146.
- Torres-Vega, M.A. González, R., Duarte, M., Poncet, D., López, S. and Arias, C.F. (2000). The C-terminal domain of rotavirus NSP5 is essential for its multimerization, hyperphosphorylation and interaction with NSP6. *J. Gen. Virol.* 81. 821-830.
- Valenzuela, S., Pizarro, J., Sandino, A.M., Vásquez, M., Fernández, J., Hernández, O., Patton, J., and Spencer, E. (1991). Photoaffinity labeling of rotavirus VP1 with 8-azido-ATP: identification of the viral RNA polymerase. *J. Virol.* 65: 3964-3967.
- van Dijk, A., E.V. Makeyev, and D.H. Bamford. (2004). Initiation of viral RNA-dependent RNA polymerization. *J. Gen. Virol.* 85: 1077-1093.
- Vasquez-Del Carpio, R., Gonzalez-Nilo, F. D., Riadi, G., Taraporewala, Z. F., and Patton, J. T. (2006a). Histidine triad-like motif of the rotavirus NSP2 octamer mediates both RTPase and NTPase activities. *J. Mol. Biol.* 362:539-554.
- Vasquez-Del Carpio, R., Gonzalez-Nilo, F.D., Jayaram, H., Spencer, E., Prasad, B.V., Patton, J.T., and Taraporewala, Z.F. (2004). Role of the histidine triad-like motif in nucleotide hydrolysis by the rotavirus RNA-packaging protein NSP2. *J. Biol. Chem.* 279, 10624-10633.
- Vásquez-del Carpio, R., Morales, J.L., Barro, M., Ricardo A. and Spencer E. (2006b) Bioinformatic prediction of polymerase elements in the rotavirus VP1 protein. *Biol. Res.* 39, 649-659.

- Vende, P., Taraporewala, Z.F., and Patton, J.T. (2002). RNA-binding activity of the rotavirus phosphoprotein NSP5 includes affinity for double-stranded RNA. *J. Virol.* 76: 5291-5299.
- Yeager, M., Berriman, J.A., Baker, T.S., and Bellamy, A.R. (1994). Three-dimensional structure of the rotavirus haemagglutinin VP4 by cryo-electron microscopy and difference map analysis. *EMBO J.* 13:1011-1018.
- Yeager, M., Dryden, K.A., Olson, N.H., Greenberg, H.B., and Baker, T.S. (1990). Three-dimensional structure of rhesus rotavirus by cryoelectron microscopy and image reconstruction. *J. Cell. Biol.* 110: 2133-2144.
- Zárate, S., Espinosa, R., Romero, P., Méndez, E., Arias, C.F., and López, S. (2000). The VP5 domain of VP4 can mediate attachment of rotavirus to cells. *J. Virol.* 74: 593-599.
- Zeng, C. Q., Wentz, M. J., Cohen, J., Estes, M. K., and Ramig, R. F. (1996). Characterization and replicase activity of double-layered and single-layered rotavirus-like particles expressed from baculovirus recombinants. *J. Virol.* 70:2736-2742.
- Zeng, C.Q., Estes, M.K., Charpilienne, A., and Cohen, J. (1998). The N terminus of rotavirus VP2 is necessary for encapsidation of VP1 and VP3. *J. Virol.* 72:201-208.