

VCH-FC
SOC-Microbiología
S717
C-1



“Análisis de las modificaciones post-traduccionales de la proteína NSP5 de Rotavirus y efecto de su expresión en *trans* sobre el ciclo viral”

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

Pablo Hernán Sotelo Torres

Marzo, 2008

Director de Tesis
Dr. Jonás Chnaiderman

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE



INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO

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

PABLO HERNÁN SOTELO TORRES

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 Tesis rendido el día 23 de julio del 2007.

Director de Tesis:

Dr. Jonás Chnaiderman

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "Jonás Chnaiderman", written over a horizontal line.

Comisión de Evaluación de Tesis

Dra. Rosalba Lagos

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "Rosalba Lagos", written over a horizontal line.

Dra. Ana María Sandino

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "Ana María Sandino", written over a horizontal line.

Dr. Octavio Monasterio

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "Octavio Monasterio", written over a horizontal line.



BIOGRAFÍA



Pablo Hernán Sotelo Torres, nació en Buenos Aires, Argentina, el 5 de mayo de 1976; realizó sus estudios de enseñanza básica y media en Paraguay y Argentina, respectivamente. Posteriormente desarrolló sus estudios universitarios de bioquímico en la Universidad Nacional de Asunción. En esta institución fue representante estudiantil y miembro de la Asamblea Universitaria. El largo periodo de tiempo que vivió en Asunción, así como las raíces familiares y afectivas que lo vinculan con el Paraguay, lo llevan a tomar la decisión de optar por la nacionalidad Paraguaya. Posteriormente obtiene una beca del DAAD del gobierno Alemán para realizar sus estudios de doctorado en la Universidad de Chile, en el ámbito de la virología. Durante el periodo de esta tesis obtuvo una beca de estadía de investigación en el instituto FMP en Berlín, Alemania, donde realizó estudios de espectrometría de Masa. Actualmente se encuentra realizando una estadía postdoctoral en la Pontificia Universidad Católica de Chile en el ámbito de tráfico celular.

AGRADECIMIENTOS

A todos los compañeros de laboratorio que me acompañaron en esta aventura, disculpen si me olvido de alguno, pero ustedes ya me conocen la memoria no es uno de mis mayores atributos. A los miembros del laboratorio de Virología de la USACH: Fernando, Ricardo, Alba, Tamara, Julio, David, Lucía y Jorge, que me recibieron recién llegado de Paraguay y me hicieron sentir como en casa. Quisiera agradecer especialmente a María Teresa Castillo, quien me enseñó las primeras herramientas para trabajar con Rotavirus, vos sabes lo invaluable de tus enseñanzas. Al profesor Spencer por la confianza depositada en mí en cada paso de este doctorado.

A los miembros del Departamento de Virología de la Universidad de Chile por su acogida, paciencia y comprensión. A todos aquellos que han pasado por el laboratorio del Dr. Oscar León, en particular a Roberto, Beatriz y Daniel, por el apoyo y amistad que me han demostrado.

A mis compañeros del Laboratorio de Replicación Viral: Coni, Pepa, Tamara y muy especialmente a Nicolás Cifuentes, vos sabes que sin tu ayuda esta tesis no hubiera sido posible. Su amistad y afecto ha hecho que este viaje sea una experiencia fantástica, espero que el tiempo permita que nuestros destinos se crucen nuevamente.

A mi tutor Jonás Chnaiderman no solo por su generosa guía en esta tesis, sino también por enseñarme, con su ejemplo, que la actividad científica no solo se basa en la capacidad profesional, sino también en la humana. Ha sido un verdadero placer trabajar contigo.

Al laboratorio de análisis de péptidos del FMP en Berlín, por recibirme con los brazos abiertos (sin saber a lo que se arriesgaban) y hacer de mi estadía en Alemania una gran experiencia. Quisiera en particular agradecer a Eberhard y Micha por el compromiso puesto en el proyecto, demostrándome que una colaboración no solo se basa en intereses científicos comunes, sino fundamentalmente en las personas, que con su actitud permiten que estos prosperen.

A los hermanos que nunca tuve y la vida se encargó de compensarme, la distancia y el tiempo jamás podrán romper nuestra amistad, ya que cuando el mundo desaparezca alrededor de una mesa, lograremos, como siempre, quebrar el tiempo y se sentirá como ayer.

A mis padres, gracias por el apoyo y la confianza que siempre me han dado, el tiempo ha hecho cambios, pero en nada cambió lo que pienso y siento por ustedes, los amo.

A mi familia, Patricia y Jimena gracias por sostenerme en los momentos difíciles, por alegrarme cada mañana y por poder afirmar, sin lugar a dudas, que a su lado soy el hombre más feliz del mundo.

INDICE DE MATERIAS.

| | |
|--|------|
| Indice de Materias. | V |
| Lista de Tablas. | VIII |
| Lista de Figuras. | IX |
| Lista de Símbolos y Abreviaturas | X |
| Resumen. | XII |
| Abstract. | XIV |
| Introducción. | 1 |
| 1.1. Generalidades. | 1 |
| 1.2. Estructura del virión. | 2 |
| 1.3. Ciclo infectivo. | 4 |
| 1.4. Replicación. | 7 |
| 1.5. Modificaciones de NSP5 y rol en la replicación. | 9 |
| 1.6. Antecedentes del trabajo. | 12 |
| Hipótesis. | 16 |
| Objetivo General. | 16 |
| Objetivos Específicos. | 16 |
| Materiales y Métodos | 18 |
| 2.1. Cultivo celular. | 18 |
| 2.2. Infección y propagación viral. | 18 |
| 2.3. Determinación del título viral. | 19 |
| 2.4. Expresión de NSP5 en células MA104. | 19 |

| | |
|---|----|
| 2.4.1. Clonamiento de NSP5, NSP5u y CFP-NSP5 en el sistema lentiviral. | 20 |
| 2.4.2. Purificación de DNA y preparación del vector lentiviral. | 25 |
| 2.4.3. Transducción de células MA104 con el vector lentiviral. | 25 |
| 2.5. Interferencia de NSP5. | 26 |
| 2.6. Inmunofluorescencia. | 27 |
| 2.7. Análisis de la producción de proteínas virales. | 28 |
| 2.8. Análisis de la producción de dsRNA. | 28 |
| 2.9. Ensayos de co-inmunoprecipitación. | 29 |
| 2.9.1. Co-inmunoprecipitación de la DLP in vivo. | 29 |
| 2.9.2. Preparación de DLP. | 30 |
| 2.9.3. Co-inmunoprecipitación de la DLP in vitro. | 30 |
| 2.10. Transcripción in vitro. | 31 |
| 2.11. Análisis de NSP5 por MS. | 31 |
| 2.11.1. Purificación de NSP5. | 31 |
| 2.11.2. Digestión con Proteasas. | 32 |
| 2.11.3. Análisis de péptidos e interpretación de datos. | 33 |
| Resultados | 35 |
| 3.1. Expresión en trans de NSP5, interferencia de NSP5 y ensayos de trans-complementación. | 35 |
| 3.2. La expresión en trans de NSP5 inhibe la producción de partículas virales. | 40 |
| 3.3. La expresión en trans de NSP5 inhibe la formación de viroplasmias. | 42 |
| 3.4. CFP-NSP5 se incorpora a los viroplasmias y forma agregados dependientes de la infección. | 45 |
| 3.5. CFP-NSP5 inhibe la formación de partículas virales y viroplasmias. | 47 |
| 3.6. El efecto inhibitorio de NSP5 es revertido por un aumento en la MOI. | 50 |
| 3.7. La expresión en trans de NSP5 inhibe la síntesis de proteínas virales. | 53 |

| | |
|--|-----|
| 3.8. NSP5 no interacciona con la DLP. | 54 |
| 3.9. NSP5 no afecta la actividad transcripcional de la DLP in vitro. | 58 |
| 3.10. La expresión proteica es necesaria para la formación de agregados de CFP-NSP5. | 58 |
| 3.11. NSP5 es fosforilada en múltiples sitios durante la infección. | 63 |
| 3.12. Las isoformas de 26 y 28 kDa presentan diferentes niveles de fosforilación. | 68 |
| 3.13. NSP5 es acetilada en su extremo amino terminal. | 69 |
| 3.14. NSP5 presenta un puente disulfuro intramolecular en un contexto característico de oxidoreductasas. | 71 |
| 3.15. Conservación de las modificaciones identificadas entre cepas de Rotavirus. | 76 |
| 3.16. Análisis de proteínas que interactúan con NSP5 por medio de MS. | 78 |
| Discusión. | 80 |
| Perspectivas. | 96 |
| Conclusiones. | 98 |
| Bibliografía. | 100 |

LISTA DE TABLAS.

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Partidores y siRNA _____ | 24 |
| Tabla 2. Cuantificación por inmunofluorescencia de la tasa de trans-complementación de NSP5. _____ | 39 |
| Tabla 3. Sitios de fosforilación de NSP5. _____ | 65 |
| Tabla 4. Proteínas que interactúan con NSP5 _____ | 79 |

LISTA DE FIGURAS.

| | |
|---|----|
| Figura 1. Estructura Viral y composición del genoma. _____ | 3 |
| Figura 2. Ciclo infectivo del Rotavirus. _____ | 6 |
| Figura 3. Esquema del vector lentiviral usado para la expresión de NSP5. _____ | 22 |
| Figura 4. Clonamiento de NSP5 y variantes. _____ | 23 |
| Figura 5. Expresión de trNSP5 y efecto del siRNA sobre la infección por Rotavirus. _ | 36 |
| Figura 6. Trans-complementación de NSP5. _____ | 37 |
| Figura 7. Efecto inhibitorio de NSP5 sobre la formación de partículas infectivas de Rotavirus. _____ | 41 |
| Figura 8. Efecto inhibitorio de NSP5 sobre la formación de viroplasmata. _____ | 43 |
| Figura 9. Expresión y formación de agregados de CFP-NSP5. _____ | 46 |
| Figura 10. Efecto de CFP-NSP5 sobre la producción de partículas y la formación de viroplasmata. _____ | 49 |
| Figura 11. Efecto inhibitorio de CFP-NSP5 es revertido por un aumento de la MOI. _ | 51 |
| Figura 12. Efecto de CFP-NSP5 sobre la producción dsRNA. _____ | 52 |
| Figura 13. Efecto de CFP-NSP5 sobre la producción de proteínas virales. _____ | 55 |
| Figura 14. Co-precipitación de partícula entrante. _____ | 57 |
| Figura 15. Co-precipitación de la DLP <i>in vitro</i> . _____ | 59 |
| Figura 16. Efecto de CFP-NSP5 sobre la actividad transcripcional de la DLP. _____ | 60 |
| Figura 17. La DLP no induce la formación de agregados de CFP-NSP5 en presencia de CHX. _____ | 62 |
| Figura 18. Fragmentos de la proteína NSP5 cubiertos en el análisis de MS. _____ | 64 |
| Figura 19. Fosforilación de la serina 42 _____ | 67 |
| Figura 20. Cinética de los sitios de fosforilación. _____ | 70 |
| Figura 21. Acetilación y posible fosforilación de la serina 2. _____ | 72 |
| Figura 22. Análisis del puente disulfuro intramolecular. _____ | 75 |
| Figura 23. Alineamiento entre diferentes cepas de Rotavirus. _____ | 77 |
| Figura 24. Esquema de modificaciones post-traduccionales identificadas en NSP5. _ | 88 |

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

| | |
|--------------------|--|
| dsRNA: | RNA de doble hebra. |
| trNSP5: | NSP5 suministrada en <i>trans</i> . |
| MOI: | Multiplicidad de infección. |
| siRNA: | RNA de interferencia. |
| DLP: | Partícula de doble cubierta. |
| VP: | Proteínas virales estructurales. |
| NSP: | Proteínas virales no estructurales. |
| mRNA: | RNA mensajero |
| RNA ⁺ : | RNA de polaridad positiva |
| RE: | Retículo endoplásmico. |
| TLP: | Partículas de triple cubierta. |
| SVP: | Partículas subvirales. |
| RI: | Intermediarios de replicación. |
| VLS: | Estructuras tipo viroplasmas. |
| GFP: | Proteína verde fluorescente. |
| UTR: | Regiones no traducidas |
| ssRNA: | RNA de simple hebra. |
| PKC: | Proteína quinasa C. |
| CKI: | Caseína quinasa 1. |
| CKII: | Caseína quinasa 2. |
| IFI: | Inmunofluorescencia indirecta. |
| PP: | Partícula primigenia. |
| DLP-PP: | DLP derivada de la partícula primigenia. |
| MS: | Espectrometría de masas. |
| MEM: | Medio esencial mínimo. |
| SFB: | Suero fetal bovino. |
| PBS: | Tampón fosfato salino. |
| h. p. i.: | horas post-infección. |

| | |
|----------------------------|---|
| CHX: | Cicloheximida. |
| SIV: | Virus de la inmunodeficiencia de simio. |
| PFA: | Paraformaldehído. |
| ACN: | Acetonitrilo. |
| TFA: | Acido trifluoro acético. |
| DTT: | Ditiotreitol. |
| nanoLC: | Nano cromatografía líquida. |
| ESI: | Ionización por electrospray |
| MS/MS: | Análisis de masas en <i>tandem</i> . |
| QTOF: | Cuadrapolo-Tiempo de vuelo. |
| CFP: | Proteína fluorescente Cian. |
| ³⁵ S-metionina: | Metionina marcada con azufre 35. |
| UV: | Ultravioleta. |
| NAG: | N-Acetil glucosamina. |
| Co-ppt: | Co-precipitación. |

RESUMEN.

Rotavirus pertenece a la familia *Reoviridae* y presenta un genoma de 11 segmentos de RNA doble hebra. El proceso de síntesis de hebras negativas de RNA utilizando como templado el RNA de polaridad positiva viral se denomina replicación y ocurre en estructuras subcelulares denominadas viroplasma. NSP5 es una fosfoproteína viral que forma parte de los viroplasma y es esencial para la replicación.

La no disponibilidad de un sistema de genética reversa para NSP5 ha impedido hasta el momento estudiar el rol preciso de esta proteína, así como el de sus modificaciones post-traduccionales en el ciclo viral. Como una alternativa en este trabajo se propuso el desarrollo de un sistema de transcomplementación basado en el uso de siRNA para bloquear la expresión viral de NSP5 combinado con la expresión en *trans* de la proteína utilizando un sistema lentiviral. Sorprendentemente, al realizar los ensayos de transcomplementación, se observó que la expresión de NSP5 recombinante (trNSP5) en un momento previo a la infección era capaz de inhibir el ciclo viral.

Al analizar las distintas variables, asociadas a diferentes estadios del ciclo viral, tales como: la formación de partículas, la producción de viroplasma (replicación y ensamblaje viral), la síntesis de dsRNA (replicación viral) y proteínas (traducción viral), pudimos observar que este efecto inhibitorio ocurre en eventos tempranos previos a la replicación.

Al aumentar el número de partículas de Rotavirus con que se infecta la célula (MOI), pudimos revertir parcialmente este efecto inhibitorio, sugiriendo un rol de la partícula de doble cubierta (double layer particle -DLP-) en este fenotipo. Sin embargo,

no se pudo observar una interacción directa de NSP5 con la DLP. Tampoco se observó una alteración en el actividad transcripcional de la DLP *in vitro*, por acción de NSP5. Esto sugiere que la acción inhibitoria de NSP5 no ocurre sobre la DLP sino más bien en eventos post-transcripcionales previos a la replicación, donde un mayor número de DLPs permite un aumento del mRNA viral, lo que neutralizaría la inhibición.

Además, se realizó un análisis de las modificaciones post-traduccionales de NSP5 durante la infección por medio de espectrometría de masas. En este análisis se cubrió más de un 95% de la secuencia de NSP5. Se identificaron 9 sitios, que presentaban diferentes grados de fosforilación. Al comparar los sitios identificados no se observaron diferencias entre las isoformas 26, 28 y 35 kDa, además se realizó un análisis cuantitativo del porcentaje de fosforilación. Nuestros resultados sugieren que los cambios en la migración de NSP5 no se deben a la fosforilación en un sitio específico sino mas bien a un aumento en las fosforilaciones en diferentes posiciones

También se logró identificar otras modificaciones post-traduccionales tales como la acetilación de la serina 2 y la formación de un puente disulfuro intracadena. Se discute la conservación de estas modificaciones entre cepas de Rotavirus y su posible rol.

ABSTRACT.

Rotavirus belongs to *Reoviridae* family and it has a genome composed by 11 segments of double strand RNA (dsRNA). The synthesis of negative strands of RNA using positive strand RNA as template is called replication and occurs in subcellular structures called viroplasms. NSP5 is a viral phosphoprotein that is part of the viroplasm and it is essential for the replication.

The lack of a reverse genetics system for NSP5 has hindered efforts to define the role of posttranslational modifications and enzymatic activities of NSP5. As an alternative, we have attempted to develop a trans-complementation system that uses a siRNA to block viral NSP5 expression in infected cells combined with a lentivirus-based expression system that supports production of NSP5. Surprisingly, when trans-complementation assays were carried out, we found that expression of the recombinant NSP5 (trNSP5) previous to infection, was able to inhibit the viral cycle.

Different variables associated with different stages of viral cycles were analyzed, notably particle production, replication and protein synthesis. We found that this inhibitory effect occurs early in the infection in a period previous to replication.

An increase in the MOI partially reverted the inhibitory effect, suggesting a role of the double layer particle (DLP) in this phenotype. However we were not able to establish a direct interaction between NSP5 and DLP. Neither, we observed an effect of trNSP5 in the in vitro transcriptional activity of DLP. This suggests that DLP is not directly involved in NSP5 inhibitory effect. These results suggest that this effect occurs in a period after transcription and previous to replication.

Also we carried out an analysis of NSP5 post-translational modifications by mass spectrometry (MS). Using different enzymatic digestions almost 95% of the NSP5 sequence was covered by MS experiments. Nine different phosphorylated sites were found with diverse phosphorylation degrees. No differences with respect to phosphorylation positions were found between isoforms. Additionally, our results suggest that changes in the migration of NSP5 are not due a phosphorylation in a specific position but well to an increase in phosphorylation of different positions.

Moreover, we identified an N-acetylation in serine 2 and an intermolecular disulfide bond. In this thesis we discuss the relevance and conservancy of these modifications.

INTRODUCCIÓN.

1.1. Generalidades.

Rotavirus es el principal agente causal de diarrea aguda en niños y recién nacidos. Se estima que medio millón de muertes son causadas por este virus anualmente en el mundo (Parashar et al., 2003), por ello la Organización Mundial de la Salud ha estimado prioritario el desarrollo de una vacuna (Singh, 2003). En la actualidad existen dos vacunas en el mercado, las cuales han probado ser efectivas para controlar la enfermedad (Glass et al., 2006). Rotavirus también es causa de enfermedades entéricas en otros vertebrados tales como aves, reptiles y mamíferos (Kapikian et al., 2001).

Este virus es miembro de la familia *Reoviridae*. La partícula viral esta compuesta por 3 capas proteicas concéntricas, las cuales envuelven un genoma con 11 segmentos de RNA de doble hebra (dsRNA), que codifican 6 proteínas estructurales (VP) y 6 proteínas no estructurales (NSP).

Los Rotavirus se clasifican, según sus características antigénicas, en grupos, subgrupos y serotipos (Hoshino y Kapikian, 2000). Las características antigénicas de VP6 permite clasificar a los Rotavirus en 7 grupos (A-G). El grupo A es el más común en humanos, también se han reportado infecciones con virus provenientes de los grupos B y C. La clasificación de subgrupo también se hace en base a la proteína VP6. Los principales patógenos humanos corresponden a los subgrupos I y II. Las características antigénicas de las proteínas VP4 y VP7 determinan la clasificación de serotipo. La reactividad con anticuerpos monoclonales de la proteína VP4 ha permitido dividir en 11

diferentes serotipos denominados P1 al P11 (se denominan P debido a que VP4 es sensible a proteasas), de igual manera la reactividad de anticuerpos contra VP7 ha permitido dividir en 14 serotipos denominados G (glicoproteína).

1.2. Estructura del virión.

El virión está compuesto por 3 cubiertas proteicas concéntricas (Fig. 1). La capa externa está constituida por 780 moléculas de la glicoproteína VP7, la cual forma una estructura con una simetría icosaédrica con un número de triangulación $T=13$. Además, esta cubierta esta formada por 60 dímeros de la proteína VP4, los cuales presentan una arquitectura radial sobresaliente. Esta cubierta participa en la adsorción y penetración del virus.

La cubierta intermedia del virión esta formada por 260 trímeros de VP6, los que se encuentran organizados en una estructura icosaédrica con un número de triangulación $T=13$ (Mathieu et al., 2001; Prasad et al., 1988). Esta estructura permite la formación de múltiples canales sobre o cercanos a cada uno de los vértices que se extienden desde la cubierta intermedia hacia la cubierta interna (Estes, 2001). Estos canales participarían en la entrada de sustratos y metabolitos, además de la exportación de los mensajeros virales (Lawton et al., 1997; Sandino et al., 1986).

La cubierta interna (o "core") está compuesta por 60 dímeros de la proteína VP2 que se encuentran organizados en una estructura icosaédrica con un número de triangulación $T=1$. En cada uno de los 12 vértices producidos en esta estructura, se encuentran dos enzimas virales: VP1, la RNA polimerasa RNA dependiente y VP3, una guanilil-transferasa (Estes, 2001; Prasad et al., 1996). Cada segmento de dsRNA estaría

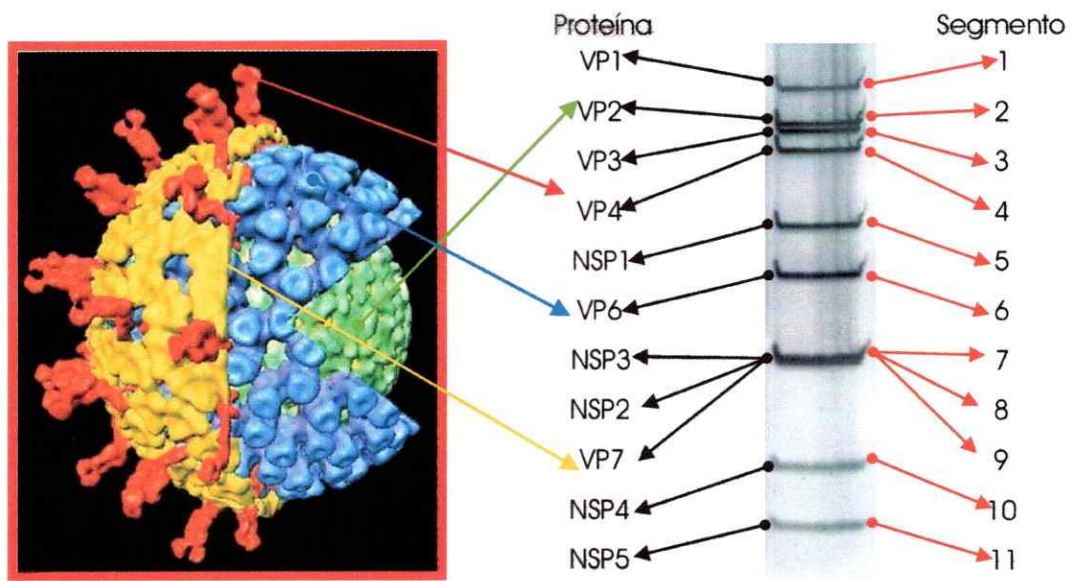


Figura 1. Estructura Viral y composición del genoma. A la izquierda se observa una representación tridimensional de la partícula viral, se ilustran con flechas las proteínas estructurales. A la derecha se observan los 11 segmentos de dsRNA de la cepa SA11 de Rotavirus, se identifica los segmentos y la proteína que codifica.

organizado en forma de tirabuzón en uno de los vértices de la capa interna (Prasad et al., 1988), por lo que se sugiere que cada uno de los segmentos del genoma viral estaría interactuando con una molécula de VP1 y de VP3 (Prasad et al., 1996).

1.3. Ciclo infeccioso.

Pese a que el Rotavirus realiza la infección a nivel del epitelio gastrointestinal, la mayoría de los estudios del ciclo viral se han realizado en el modelo celular MA104, que no son polarizadas

Se postula que la unión del Rotavirus a la célula se realiza a través de la interacción con varias proteínas celulares, entre ellas distintos tipos de integrinas, las cuales deben interactuar en forma precisa y ordenada con la partícula. Varios mecanismos de entrada han sido propuestos, desde diferentes tipos de endocitosis hasta fusión de membranas. Sin embargo no existe consenso sobre el mecanismo exacto de entrada del virus a la célula (Lopez y Arias, 2004).

Una vez que la partícula de Rotavirus ha ingresado a la célula (Fig. 2), pierde su cubierta externa (Estes, 2001), lo cual produce una partícula de doble cubierta (double layer particle -DLP-) transcripcionalmente activa, esto permite la producción de RNA de polaridad positiva (RNA⁺) (Helmberger-Jones y Patton, 1986; Lawton et al., 2001; Patton y Gallegos, 1990). Los RNAs⁺ poseen una estructura *cap* incorporada por la proteína VP3 (Estes, 2001) pero no son poliadenilados, sin embargo funcionan como mensajeros virales para la síntesis proteica, por lo que se ha propuesto la presencia de un mecanismo viral para favorecer su traducción. En este modelo la proteína viral NSP3 funcionaría como un regulador positivo de la traducción ya que al interactuar con

extremo 3' del mRNA viral y con el factor eIF4G favorecería su traducción (Piron et al., 1999; Piron et al., 1998). Recientemente este modelo ha sido cuestionado debido a que al inhibir la expresión de NSP3 por medio de RNA de interferencia (siRNA) durante la infección, no se afectó significativamente la expresión de proteínas virales (Montero et al., 2006).

Los RNAs⁺ son utilizados como templado para la síntesis de las hebras negativas de RNA, dando como producto un dsRNA en un proceso denominado replicación genómica. Los mecanismos que llevan al reclutamiento de los RNA⁺ y morfogénesis del Rotavirus no son conocidos. Debido a que no se ha encontrado dsRNA ni cápsides libres en la célula, se ha propuesto que el reclutamiento, la replicación y la morfogénesis ocurren simultáneamente (Gallegos y Patton, 1989). El modelo actual de morfogénesis de Rotavirus propone que los RNAs⁺ virales se encuentran interactuando con los componentes del *core* por lo que la replicación y empaquetamiento ocurrirían en forma sincronizada (Patton y Spencer, 2000). Este proceso ocurre en unas estructuras virales cercanas al retículo endoplásmico (RE) denominadas viroplasmatas (Gonzalez et al., 2000; Petrie et al., 1984), que actuarían como verdaderas “fábricas” de *cores*.

Posteriormente, los *cores* son recubiertos por la proteína estructural VP6 formando nuevas DLPs, que pueden seguir dos caminos, no excluyentes: I) constituir nuevas fábricas de mensajeros virales produciendo lo que se denomina “segunda ola de transcripción” (Estes, 2001), II) ser introducidas al RE por acción de la proteína NSP4 (Mirazimi et al., 2003; O'Brien et al., 2000).

En el RE las DLP se recubren por la proteína VP7 para formar partículas de triple cubierta (triple layer particle -TLP-), durante este proceso hay un estadio intermedio en

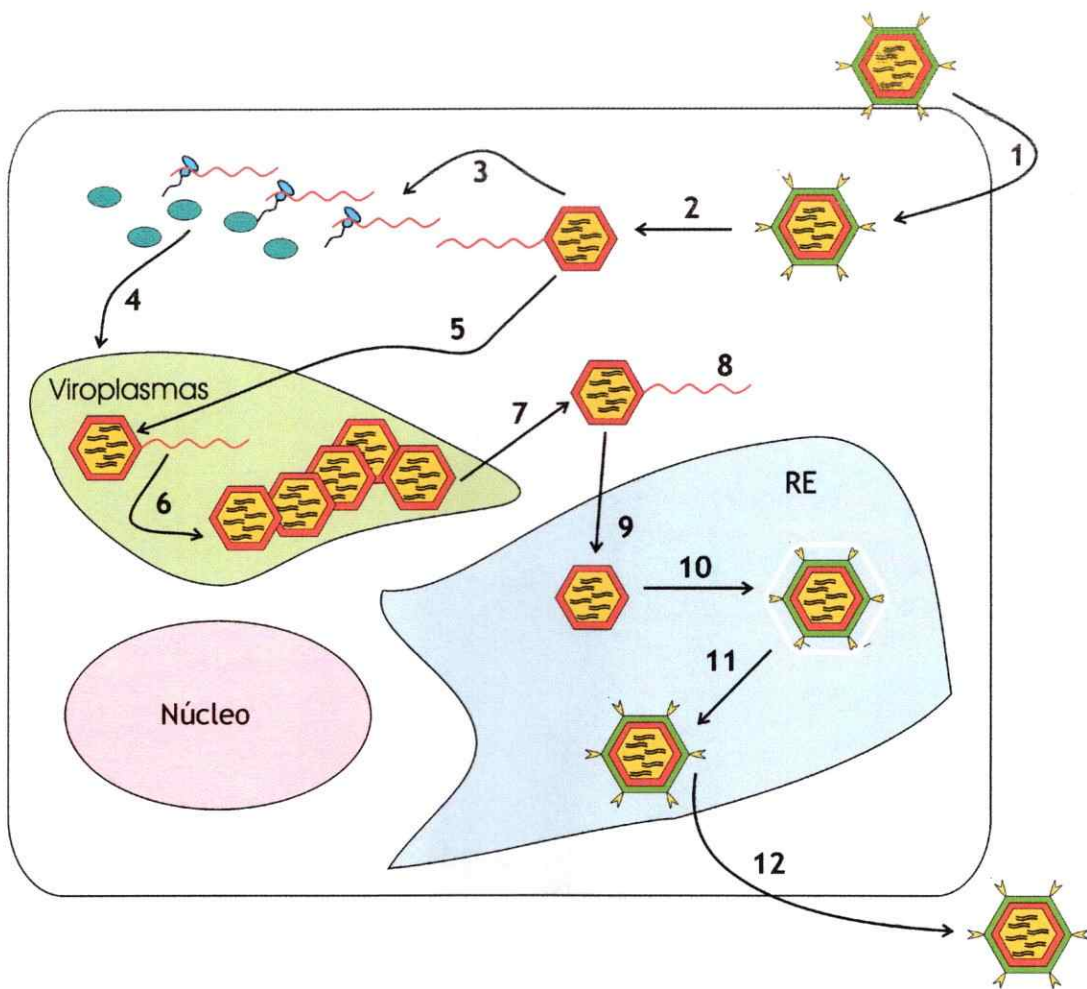


Figura 2. Ciclo infeccioso del Rotavirus. (1) Entrada del virus a la célula. (2) Pérdida de la cubierta externa y activación de la transcripción. (3) Traducción de mensajeros virales y producción de proteínas virales. (4) Formación de los viroplasmos. (5) La DLP forma parte activa de los viroplasmos produciendo los RNAs⁺ utilizados para la replicación. (6) Replicación y ensamblaje de nuevas DLPs. (7) Salida de nuevas DLPs al citoplasma. (8) Las nuevas DLPs generan la segunda ola de transcripción. (9) Entrada de las DLPs al RE vía NSP4. (10) Formación de TLP con cubierta lipídica. (11) Pérdida de la cubierta lipídica y formación de TLP madura. (12) Salida de nuevas partículas.

el cual la partícula posee una membrana lipídica (Petrie et al., 1984). Los mecanismos por los que se incorpora VP4 a la TLP, son actualmente tema de discusión ya que VP4 es una proteína citoplasmática que no se ha detectado en el RE. Un modelo reciente ha propuesto que el ensamblaje de VP4 ocurre en un compartimiento entre el RE y el aparato de Golgi donde la participación de *rafts* sería fundamental (Delmas et al., 2004). Las TLPs son liberadas, en células no polarizadas, por lisis celular. Sin embargo en células polarizadas CaCo2, las partículas son transportadas a la región apical para luego ser liberadas por un mecanismo aún no identificado (Jourdan et al., 1997).

1.4. Replicación.

La síntesis de los RNAs⁺ virales al interior de la célula se detecta en la primera hora post-infección (h. p. i.), sin embargo la síntesis de dsRNA se detecta recién a las 4 h. p. i. (Patton y Gallegos, 1990); se ha propuesto que esta ventana de tiempo se debe a la necesidad de formar las estructuras necesarias para la replicación (viroplasmata). El fraccionamiento de células infectadas utilizando métodos de ultracentrifugación, ha permitido purificar partículas subvirales (sub-viral particle -SVP-). Estas SVPs se encuentran en diversos estadios en la síntesis de la hebra negativa. El análisis de la estructura de los SVPs ha permitido observar que los productos de dsRNA son simultáneamente internalizados en intermediarios de replicación (replication intermediate -RI-), estructuralmente semejantes a los *cores*, y se encuentran parcialmente recubiertos por VP6 (Gallegos y Patton, 1989; Patton y Gallegos, 1988). Las SVPs constituyen una mezcla heterogénea compuesta por las proteínas VP1, VP2, VP3 y VP6 y por las proteínas no estructurales NSP1, NSP2, NSP3 y NSP5. El análisis

de la composición de las diferentes SVPs ha llevado a proponer un modelo donde el *precore* RI (compuesto por VP1, VP2, NSP1, NSP2, NSP3 y NSP5) serviría como centro de nucleación donde en presencia de VP2 se formarían los vértices de la capa interna. Finalmente a medida que los pentámeros de VP2 interactúan entre sí, se cerraría el *core* y ocurriría la elongación de la hebra negativa (Patton y Spencer, 2000).

La replicación del Rotavirus ocurre en estructuras especializadas, los viroplasmos, los que están formados esencialmente por las mismas proteínas que forman los SVPs, las proteínas estructurales VP1, VP2, VP3 y VP6 y las proteínas no estructurales NSP2, NSP5 (Gonzalez et al., 2000). Se ha observado que NSP5 y NSP2 son capaces de interactuar independiente de otras proteínas virales (Eichwald et al., 2004b; Gonzalez et al., 1998). Al co-expresar dichas proteínas en células MA104 se forman agregados denominados estructuras tipo viroplasmos (viroplasm like structures-VLS-) (Fabbretti et al., 1999). Existen resultados controversiales respecto a la posibilidad de que NSP5 sea capaz de formar VLS, construcciones de NSP5 con la proteína verde fluorescente (green fluorescence protein-GFP-) unida al extremo amino de NSP5, al ser expresadas en células MA104 forman agregados de tipo VLS (Mohan et al., 2003). Sin embargo, este experimento no pudo ser reproducido en otra construcción similar (Eichwald et al., 2004b). Se propone que NSP5 actuaría en forma de homodímeros en células infectadas (Poncet et al., 1997; Torres-Vega et al., 2000). Esto ha llevado a proponer que NSP5 actuaría en el andamiaje de la maquinaria de replicación.

El uso de un sistema de replicación *in vitro* ha permitido encontrar secuencias dentro de las regiones no traducidas (untranslated regions-UTR-) y de las regiones

códicantes en los RNAs^r virales que son necesarias para este proceso (Patton et al., 1996) (Barro et al., 2001). Pese a que este sistema funciona en ausencia de NSP2 y NSP5 se observó que al realizar un *knock down* por siRNA de alguna de estas dos proteínas durante la infección, se inhibe la formación de viroplasmias y la producción de dsRNA (Campagna et al., 2005; Lopez et al., 2005; Silvestri et al., 2004), demostrando el rol primordial de ambas proteínas en la replicación y ensamblaje del Rotavirus.

NSP2 es una proteína básica de 35kDa, codificada por el gen 8. Estudios bioquímicos lograron demostrar que NSP2 es capaz de multimerizar en octámeros, de interactuar, en forma inespecífica, con RNA de simple hebra (ssRNA) y dsRNA y de poseer una actividad nucleótido trifosfatasa (NTPasa) (Taraporewala et al., 1999; Taraporewala et al., 2002). El modelo actual de NSP2 consiste en una estructura tipo “rosquilla” constituida por dos tetrámeros, que funcionaría como un motor empaquetador del genoma de la partícula (Jayaram et al., 2002; Taraporewala et al., 1999; Taraporewala et al., 2002). Por último, utilizando un anticuerpo anti-NSP2 se ha podido co-precipitar complejos con actividad replicasa (Aponte et al., 1996), demostrando su rol en la replicación.

1.5. Modificaciones de NSP5 y rol en la replicación.

NSP5 es una proteína sujeta a diversas modificaciones post-traduccionales. Se ha propuesto que es O-glicosilada en células infectadas por la cepa de Rotavirus OSU (Gonzalez y Burrone, 1991), sin embargo no se han reportado otros trabajos que confirmen estos resultados. El estudio de las modificaciones post-traduccionales de NSP5 se ha centrado en la fosforilación, ya que esta modificación lleva a la formación

dé diferentes isoformas con masas moleculares de 26 kDa, 28 kDa, 30 kDa y 35 kDa (Blackhall et al., 1998). En la literatura se menciona a la forma de 28 kDa como “fosforilada” y a las de 30 a 35 kDa como “hiperfosforiladas”, a pesar de que ensayos de marcaje metabólico han demostrado que la isoforma de 26 kDa también posee radicales fosfato (Blackhall et al., 1997; Chnaiderman et al., 2002). NSP5 al ser expresada en bacterias presenta un peso molecular aproximado de 26 kDa (Poncet et al., 1993; Vende et al., 2002) y al ser expresada en células de insecto se observa la formación de las isoformas de 26 kDa y 28 kDa (Chnaiderman et al., 2002; Fabbretti et al., 1999; Vende et al., 2002). Cuando las isoformas fosforiladas e hiperfosforiladas son tratadas *in vitro* con fosfatasas, se recupera sólo la isoforma de 26 kDa confirmando que los cambios en la migración son a causa de diferentes eventos de fosforilación (Blackhall et al., 1997; Eichwald et al., 2002; Torres-Vega et al., 2000). Se ha identificado que NSP5 se fosforila en residuos de serina (Blackhall et al., 1997).

Se ha observado que al expresar NSP5 en células MA104 es capaz de hiperfosforilarse a una tasa menor que en el ámbito de la infección (Torres-Vega et al., 2000) y que la presencia de NSP2 aumenta la hiperfosforilación (Afrikanova et al., 1998). Al fusionar la proteína GFP al extremo amino terminal de NSP5 se incrementa la hiperfosforilación al ser expresadas en células MA104 (Mohan et al., 2003).

Se ha propuesto que NSP5 posee actividad autoquinasa (Blackhall et al., 1997; Poncet et al., 1997; Vende et al., 2002), sin embargo se ha descrito la necesidad de quinasas celulares para los eventos de hiperfosforilación de NSP5 (Eichwald et al., 2002). El uso de inhibidores de proteína quinasa C (PKC) tales como Staurosporina y H7 han demostrado tener un efecto en la hiperfosforilación de NSP5 y el ciclo de

Rotavirus (Blackhall et al., 1998; Chnaiderman et al., 2002). Además la caseína quinasa 1 (CKI), y la caseína quinasa 2 (CKII) pueden fosforilar a NSP5 *in vitro* (Eichwald et al., 2004a; Eichwald et al., 2002). Por otro lado el uso de inhibidores de fosfatasas celulares aumenta la cantidad de las isoformas hiperfosforiladas (30 kDa y 35 kDa) durante la infección (Blackhall et al., 1998). Estos antecedentes sugieren un rol activo de quinasas y fosfatasas en la formación de las diferentes isoformas de NSP5.

Un análisis utilizando la expresión de mutantes de delección de NSP5, ha llevado a plantear la dependencia de la fosforilación de la serina 67 en la hiperfosforilación, ya que mutantes en esta serina son incapaces de inducir la hiperfosforilación de NSP5. Esto ha llevado a proponer un modelo en el que la interacción de NSP5 con NSP2 provoca la fosforilación de la serina 67 por acción de la CKI e induce la hiperfosforilación de NSP5 (Eichwald et al., 2004a). Este modelo ha sido cuestionado recientemente por una publicación que plantea que la serina 67 no posee ningún efecto en la hiperfosforilación de NSP5 (Sen et al., 2006). Los resultados heterogéneos (y a veces contradictorios) relativos a las modificaciones post-traduccionales de NSP5 refuerzan la necesidad de contar con modelos de estudios más adecuados para responder las dudas que persisten respecto a su función.

Utilizando la misma estrategia, se ha propuesto a la región 130-180 como la responsable de la hiperfosforilación de NSP5, específicamente las serinas 153, 155, 164 y 166 (Eichwald et al., 2002).

Pese a todos estos datos no se ha podido determinar ningún sitio de fosforilación de NSP5 en el contexto de la infección. Asimismo la relación entre las modificaciones de NSP5 y la replicación del Rotavirus sigue siendo una pregunta pendiente; sólo un

répote ha relacionado la síntesis de proteínas virales con la fosforilación de NSP5 (Chnaiderman et al., 2002).

1.6. Antecedentes del trabajo.

Hemos logrado en el laboratorio, utilizando un vector lentiviral, expresar la proteína NSP5 en las células MA104 (principal modelo de estudio de la infección por Rotavirus). Con esta herramienta y ante la imposibilidad de contar con un sistema de genética reversa para proteínas no estructurales en Rotavirus, decidimos diseñar un sistema, el cual denominamos de “trans-complementación”. En este sistema se realiza un *knock down* de la expresión de la proteína NSP5 por medio de siRNA para luego, utilizando el sistema lentiviral complementar NSP5 en *trans*; este vector posee una mutación silenciosa que lo vuelve resistente al efecto del siRNA (NSP5u). A fin de diferenciar la NSP5 proveniente de la infección de la suministrada en *trans*, se denominará a esta última trNSP5.

Al realizar los ensayos de trans-complementación pudimos observar solo un 41% de las células que expresaban trNSP5 era susceptibles de ser infectadas (Sección 3.1). Esta baja tasa de trans-complementación nos llevó a proponer que la expresión en *trans* de NSP5, en un momento inadecuado (previo a la infección), podría estar afectando el ciclo viral.

Un estudio reciente nos dio una explicación posible de la causa de este efecto de trNSP5. En este estudio utilizando siRNA se degradaron los RNAs⁺ que codifican para la proteína VP7 durante la infección; es de notar que VP7 no participa en la formación de viroplasmos y por ende tampoco en la replicación del genoma de Rotavirus. Si bien



al tratar con siRNA se vieron disminuidas las cantidades de mRNA y de proteína VP7, no se observaron cambios en la producción de dsRNA para el segmento 9 (el cual codifica la proteína VP7). Además, se pudo observar actividad transcripcional dentro del viroplasma. Estos resultados llevaron a la conclusión de que los RNAs⁺ utilizados para la replicación son producidos en el viroplasma y por lo tanto se encontraban protegidos del sistema de degradación de RNA dependiente de siRNA (Silvestri et al., 2004).

Si consideramos que la única fuente conocida de RNA⁺ son las DLPs, éstas deben ser parte activa del viroplasma y responsables de producir los RNAs⁺ utilizados como templado para la replicación del genoma viral. Más aún, si consideramos que el viroplasma es el responsable de la morfogénesis del Rotavirus y por lo tanto de producir las DLPs sintetizadas *de novo* (produce los *cores* que van a dar a lugar a las DLPs), surge la siguiente pregunta: ¿cómo se produce el primer viroplasma capaz de replicar? Es posible que la partícula que infecta a la célula (partícula primigenia -PP-), una vez que ingresa produce la primera DLP (DLP-PP), que luego de sintetizar los mensajeros utilizados para la síntesis de proteínas virales, necesariamente debe ser parte del primer viroplasma para producir los RNAs⁺ que van a ser utilizados para la replicación y la producción nuevas DLPs.

La proteína NSP5 de Rotavirus es capaz de interactuar con las proteínas estructurales VP1 (Arnoldi et al., 2007) y VP2 (Berois et al., 2003), ambas componentes de la DLP. Además, en el caso de Reovirus se ha observado que la proteína μ NS es capaz de unir a la partícula primigenia de Reovirus e introducirla a estructuras semejantes a los VLS (Broering et al., 2004). μ NS presenta varias características

comunes con NSP5 tales como interactuar con σ NS (homóloga de NSP2) y formar agregados tipo viroplasma (Becker et al., 2003; Touris-Otero et al., 2004). Esto nos lleva a preguntarnos: ¿NSP5 es la encargada de reclutar la DLP al viroplasma?

Si NSP5 es la responsable directa de esta interacción con la DLP y su reclutamiento al viroplasma, al estar presente en un momento previo a la infección (como ocurre en nuestro sistema de trans-complementación), sería capaz de interactuar inmediatamente una vez formada la DLP-PP pudiendo afectar su funcionalidad y por ende inhibir la infección. Por lo demás, se ha observado que la interacción de NSP5 con VP2 permite un desplazamiento de VP6 de estructuras de tipo viral (viral like particles – VLP-) compuestas por VP2 y VP6 (Berois et al., 2003). La presencia de VP6 en la DLP es esencial para su actividad transcripcional ya que los canales formados por esta proteína facilitan la salida de los RNAs^r sintetizados *de novo*, por lo tanto ¿es posible que la expresión en *trans* de NSP5 induzca una interacción prematura con la DLP afectando su funcionalidad?

Con tales antecedentes en la primera parte de la hipótesis decidimos profundizar en este problema abordándolo por dos caminos: I) caracterizar los efectos negativos de la expresión de trNSP5 sobre la infección II) analizar la interacción entre la DLP y NSP5.

Otra de las características fundamentales de NSP5 es su capacidad de ser fosforilada durante la infección. Como se ha mencionado anteriormente varios trabajos se han realizado en torno a este tema; sin embargo queda pendiente una pregunta básica: ¿Cuál o cuáles son los sitios fosforilados en las diferentes isoformas de NSP5 en el contexto de la infección? Además, si consideramos la influencia de quinasas y

fosfatasas ¿cómo se comportan estos sitios en los diferentes momentos de la infección?, por ello y con el apoyo del Grupo del Dr. Eberhard Krause en el Instituto Leibniz de Farmacología Molecular en Berlín, Alemania decidimos abordar este problema, por medio de la técnica de espectrometría de masas (MS).

HIPÓTESIS.

1. La expresión de NSP5 previa a la infección inhibe el ciclo del Rotavirus, debido a que esta proteína interactúa con la DLP afectando su composición y actividad transcripcional.
2. Durante la infección NSP5 es fosforilada en diferentes sitios, que presentan un comportamiento dinámico variando su nivel de fosforilación durante las diferentes etapas del ciclo viral.

OBJETIVO GENERAL.

Analizar el efecto de la expresión en *trans* de NSP5 sobre el ciclo viral para estudiar la acción de NSP5 en los momentos tempranos de la infección.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Analizar el efecto de la expresión en *trans* de NSP5 sobre las diferentes etapas de la infección.
2. Determinar la interacción de NSP5 con la DLP y la DLP-PP.
3. Estudiar el efecto de NSP5 sobre la composición y actividad transcripcional de la DLP.
4. Estudiar el efecto de la DLP sobre la formación de agregados de NSP5.
5. Determinar los sitios de fosforilación de las diferentes isoformas de NSP5 durante la infección.

6. Determinar el porcentaje de fosforilación de los sitios modificados en las diferentes isoformas de NSP5 durante la infección.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Cultivo celular.

La línea celular proveniente de riñón de mono verde MA104 fue cultivada en medio esencial mínimo de EAGLE (MEM) (HyClone) en presencia de 10% de suero fetal bovino (SFB) (HyClone), HEPES 10mM y estreptomicina-penicilina (HyClone), a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂. La línea celular 293T fue cultivada en condiciones similares, con la diferencia que el suero fetal bovino utilizado en este caso fue sometido a una inactivación del sistema complemento por incubación a 56°C durante 30 minutos.

2.2. Infección y propagación viral.

La cepa SA11-4F de Rotavirus fue activada por incubación con tripsina (GIBCO) 10 µg/mL durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente, el inóculo fue diluido en MEM hasta alcanzar la multiplicidad de infección (MOI) deseada, medida en u.f.p./cél. El inóculo fue sembrado en monocapas de células MA104, previamente lavadas 2 veces con PBS. Luego de 1 hora de adsorción a 37°C, con agitación leve cada 10 minutos, el inóculo fue removido y las monocapas se mantuvieron en MEM sin suero. Los tiempos denominados "horas post-infección" (h. p. i.) se empiezan a contar desde el final del periodo de adsorción. En los casos donde se prepararon stocks virales se procedió a lisar las células por congelamiento, cuando el efecto citopático superaba al 80% (aproximadamente 24 h. p. i.).

En algunos ensayos se adicionó el inhibidor de traducción cicloheximida (CHX)(Sigma) a una concentración final de 100 μ M 1 hora antes de la infección y se mantuvo este compuesto durante toda la adsorción e infección.

La preparación de virus marcado se realizó infectando monocapas a una MOI de 9, a las 3 horas y media post-infección se agregó medio deficiente en metionina (GIBCO), media hora después se agregó medio con 35 S-metionina (NEN) a una concentración final de 50 μ Ci/ml.

2.3. Determinación del título viral.

Inóculos obtenidos en las condiciones deseadas fueron inicialmente activados con tripsina 10 μ g/mL durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas de 10 en 10 en MEM sin SFB, cada una de las cuales fue inoculada en monocapas confluentes de células MA104 en placas de 6 pocillos, previamente lavadas con PBS. Después de 1 hora de adsorción a 37°C, con agitación leve cada 10 minutos, el inóculo fue removido y a cada pocillo se le adicionó 2 ml de agarosa (0,6%) en MEM 199 (1X) y tripsina a una concentración final de 2,5 μ g/ml. Una vez gelificada la agarosa, las placas fueron mantenidas a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂ durante 3 días. Posteriormente fueron fijadas durante 30 minutos con 2 ml de formalina 37%, luego de ser retirada la agarosa, fueron teñidas con cristal violeta 2%.

2.4. Expresión de NSP5 en células MA104.

Para la expresión de NSP5 se utilizó un sistema lentiviral basado en el virus de la inmunodeficiencia de simio (SIV) (Mangeot et al., 2000). El mecanismo de

expresión de NSP5 por el sistema lentiviral se esquematiza en la Figura 3. Este sistema consta de tres componentes. El vector que codifica para la expresión de las proteínas estructurales del retrovirus (SIV3+). El vector que codifica para la producción del genoma retroviral que posee el gen de la proteína recombinante (GIVSA y derivados de Gae Pi). El vector VSVg el cual codifica para la glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular, la que permite ampliar el tropismo del vector. El vector GIVSA es un derivado de Gae pi que expresa la proteína GFP.

2.4.1. Clonamiento de NSP5, NSP5u y CFP-NSP5 en el sistema lentiviral.

Para el clonamiento de NSP5 en Gae pi se procedió a extraer el gen que codifica para NSP5 del vector pCMV-NSP5 con las enzimas HindIII y XhoI. El vector fue digerido con las mismas enzimas y desfosforilado con CIAP (Boheringer). Los fragmentos de DNA fueron purificados de gel de agarosa y ligados utilizando la enzima T4 ligasa (Fermentas). Dando como producto el vector piNSP5 (Fig. 4a).

Para la construcción de NSP5u se realizó la técnica de PCR por sobreposición (Fig. 4b). Para ello se realizó un primer PCR (PCR1) utilizando como templado piNSP5, con los partidores sqpFw y g11Untar484 (Tabla 1). Además se realizó un segundo PCR (PCR2) utilizando nuevamente como templado piNSP5, con los partidores sqpRv y g11Untar466. Los partidores Untar presentan una mutación silenciosa en nsp5 (que lo vuelve resistente al siRNA), además de ser reversos complementarios. El tercer PCR (PCR3) se realizó utilizando los productos del PCR1 y del PCR2 además de los partidores sqpFw y sqpRv. Estos últimos partidores corresponden a las regiones de Gae pi que bordean al gen nsp5, por lo que poseen los sitios de restricción presentes en sitio

de múltiple corte de Gae pi. Es por ello que el amplificado del PCR3 fue digerido con las enzimas PstI y XhoI. Además el vector Gae pi fue digerido con las mismas enzimas y desfosforilado con CIAP. Los fragmentos de DNA fueron purificados de gel de agarosa y ligados utilizando la enzima T4 ligasa. Dando como producto el vector piNSP5u.

La construcción de la proteína de fusión CFP-NSP5 se realizó en dos pasos. Inicialmente se procedió a clonar NSP5u en el vector pECFP-C1 (Clontech), amplificando el gen nsp5u a partir del vector piNSP5u, para ello se uso el mix High Fidelity (Invitrogen) con los partidores 904 y SeqRev (Tabla 1). El programa de amplificación fue el siguiente: una denaturación inicial a 96°C 3min, luego 35 ciclos de 96° 45 s., 52°C 45 s, 72°C 70 s y una extensión final de 72°C 10 min. Posteriormente el fragmento fue digerido con las enzimas BamHI y XhoI y purificados de gel. El vector pECFP-C1 fue digerido con las enzimas BglII/SalI, desfosforilado con CIAP y purificado de gel. Ambos productos fueron ligados utilizando la enzima T4 ligasa dando como resultado el vector CFPN5u (Fig. 4c).

En una segunda etapa la construcción CFP-NSP5 fue clonada en Gae pi, para ello CFPN5u fue cortado con las enzimas de restricción AgeI/BamHI y el fragmento conteniendo CFP-NSP5 fue purificado de gel. El vector Gae pi fue cortado con las enzimas AgeI/BglII, desfosforilado con CIAP y purificado de gel. Ambos productos fueron ligados utilizando la enzima T4 ligasa dando como resultado el vector piCN5u (Fig. 4d).

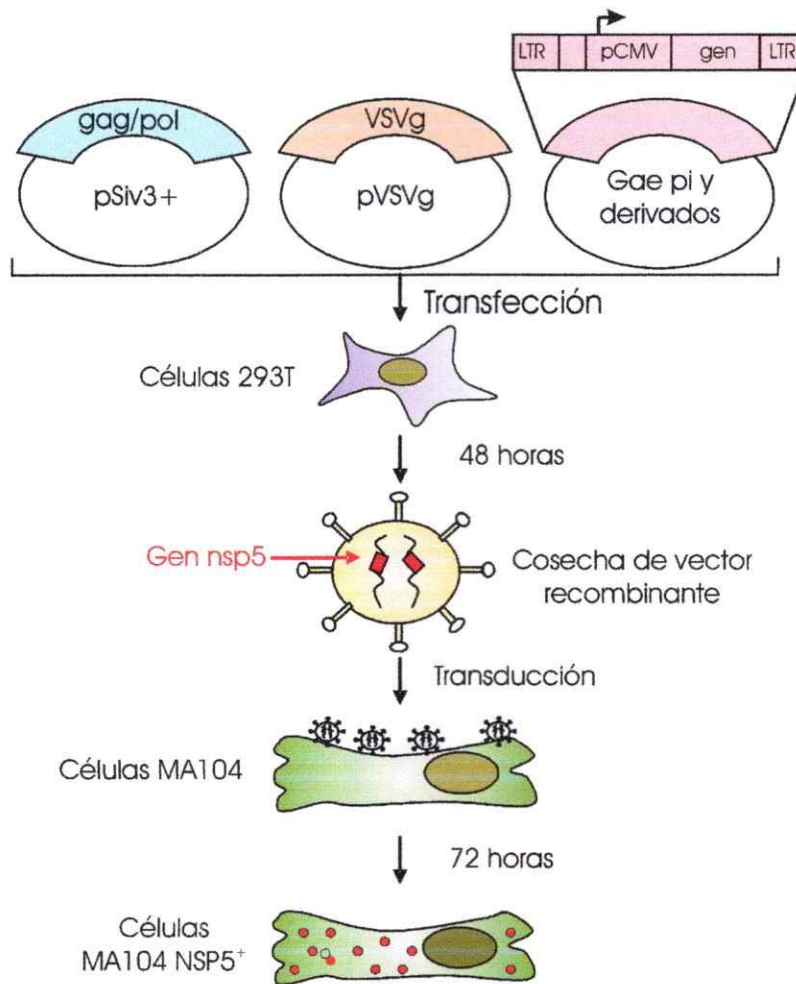


Figura 3. Esquema del vector lentiviral usado para la expresión de NSP5.

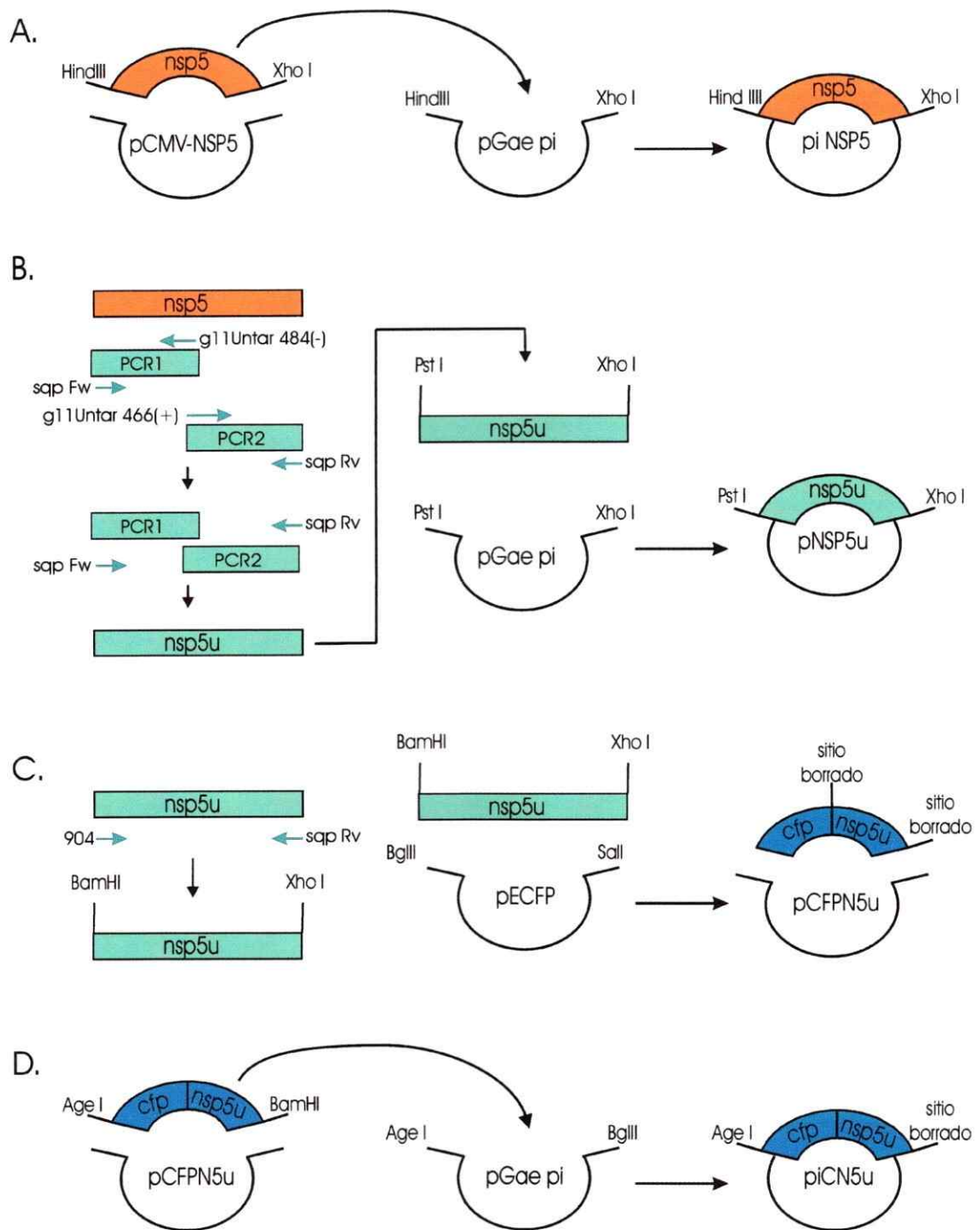


Figura 4. Clonamiento de NSP5 y variantes. (A) Clonamiento de NSP5 en el vector Gae pi. (B) Construcción de NSP5u. (C) Clonamiento de NSP5 en el vector ECFP. (D) Clonamiento de CFP-NSP5 en Gae pi.

Tabla 1. Partidores y siRNA

| Partidores | |
|-------------------|---|
| Nombre | Secuencia |
| Seq Fw | 5'-GCT'CGT TTA GTG AAC CGT CAG A-3' |
| Seq Rv | 5'-CCT GGT CCT GAG GTG TAA TCC T-3 |
| g11 Untar 466 (+) | 5'-GGA TCG AGG CGG AGT CCG ATTC AGA TGAT TAT GTA CTG G-3 |
| g11 Untar 484 (-) | 5'-CGG ACT CCG CCT CGA TCC TTG GGT AGTG CTT CCT A-3' |
| 904 | 5'-ACG CGG ATC CTC TCT CAG CAT TGA CGT-3' |

| siRNA | |
|---------------|---|
| Nombre | Secuencia |
| 465 | 5'-G AAU UGA AGC AGA GUC UGA dTdT-3' 3'-dTdTC UUA ACU UCG UCU CAG AUC-5' |

2.4.2. Purificación de DNA y preparación del vector lentiviral.

Los clones bacterianos que contenían los plasmidios de VSVg, SIV3+ y derivados de Gae pi fueron crecidos durante 18 horas a 37°C con agitación en medio Terrific Broth con 100 µg/ml de ampicilina. La purificación de los plasmidios se realizó utilizando el kit Gigaprep Jetstar (Genomed) bajo indicaciones del proveedor y el DNA purificado fue cuantificado por espectrofotometría.

Para la producción de vectores lentivirales: células 293T crecidas a un 90% de confluencia en placas de 6 pocillos, fueron transfectadas con tres plasmidios: SIV3+ (1,7 µg), VSVg (0,8µg) y GIVSA o derivados de Gae pi (2 µg) utilizando el protocolo de fosfato de calcio (Sambrook J.F., 1989). 16 horas post-transfección (h. p. t.) el medio fue reemplazado por MEM SFB 10%. El sobrenadante con vector lentiviral fue cosechado 48 h. p. t., clarificado por centrifugación durante 15 minutos a 2000 rpm y utilizado inmediatamente.

2.4.3. Transducción de células MA104 con el vector lentiviral.

Células MA104 fueron crecidas y desprendidas por tratamiento con verseno (PBS/EDTA), centrifugadas por 5 min a 2500 rpm. Luego se incubaron con MEM 6 µg/mL polibreno durante 10 min a 37 °C, se eliminó el MEM polibreno (Sigma) previa centrifugación 5 min a 2500 rpm. Posteriormente, se resuspendieron en MEM 10% de SFB que contenía 1 µM de 5-azacitidina (Sigma). La suspensión celular se mezcló 1:1 con el vector lentiviral. Todos los experimentos posteriores fueron realizados entre 65 y

72 horas post-transducción de la monocapa celular. Para efectos de esta tesis, llamaremos trNSP5 a la proteína suministrada en *trans* por el vector lentiviral.

2.5. Interferencia de NSP5.

Para los ensayos de silenciamiento monocapas confluentes de células MA104 fueron transfectadas con 4µl de siRNA 465 (Tabla 1) (DHARCON) utilizando 2 µl Lipofectamina 2000 (Invitrogen), según las indicaciones del fabricante, 12 h. p. t. se infectó a una MOI de 3. 7 h. p. i. se fijaron con paraformaldehído (PFA) y se analizaron por IFI.

Los ensayos de trans-complementación, analizados por lisis celular, se realizaron de la siguiente manera: monocapas confluentes de células MA104 fueron transducidas con el vector p π NSP5u. 64 horas post-transducción fueron transfectadas con siRNA 465. 12 horas después (72 horas post-transducción) fueron infectadas a una MOI de 1. A las 24 h. p. i las monocapas fueron fijadas durante 30 minutos con formalina 12% en PBS y finalmente teñidas con cristal violeta 2%.

Los ensayos de trans-complementación, analizados por IFI, se realizaron de la siguiente manera monocapas confluentes de células MA104 fueron transducidas con el vector correspondiente. 60 horas post-transducción fueron transfectadas con siRNA 465. 12 horas después (72 horas post-transducción) fueron infectadas a uno MOI de 3. A las 7 h. p. i las placas fueron fijadas con PFA y analizadas por IFI.

2.6. Inmunofluorescencia.

Células MA104 obtenidas en cada ensayo fueron fijadas con PFA durante 30 min a temperatura ambiente y permeabilizadas con Tritón X-100 1% en PBS por 10 min. En las co-localizaciones de NSP5 y VP6 se incubó inicialmente con el anticuerpo monoclonal murino anti-NSP5 diluido 1:500 por 1 hora a temperatura ambiente. Luego se lavó 3 veces durante 5 minutos con PBS, y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a Rodamina (Sigma) diluido 1:250. Luego de 3 lavados con PBS por 5 min, se incubó con un suero policlonal de cobayo anti-VP6 diluido 1:200 y anticuerpo secundario anti-cobayo conjugado a Alexa 488 (Sigma) dilución 1:666, con 3 lavados por 5 min con PBS entre cada anticuerpo. Finalmente la muestra fue secada y montada en DABCO conteniendo la tinción nuclear DAPI.

Para los experimentos de co-localización de CFP-NSP5 y VP2 se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón anti-VP2 diluido 1:500, y un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a Rodamina diluido 1:500, repitiéndose el procedimiento realizado anteriormente.

Para la identificación de la expresión de NSP5 se utilizó un anti-NSP5 de cobayo 1:1000 y anticuerpo secundario anti-cobayo conjugado a Alexa-488 (SIGMA) dilución 1:666.

La fluorescencia fue detectada con un microscopio de fluorescencia NIKON ECLIPSE acoplado a una cámara digital. Las imágenes fueron procesadas y analizadas

con el programa ImageJ (Rasband, 1997). Algunas imágenes fueron obtenidas en un microscopio confocal Carl Zeiss Axiovert 100M LSM 510.

2.7. Análisis de la producción de proteínas virales.

Placas de 24 pocillos con células MA104 GFP⁺ o MA104 CFP-NSP5⁺ fueron infectadas a la correspondiente MOI; 1 hora y media post-infección se reemplazó por medio deficiente en metionina (GIBCO) y a las 2 h. p. i. se agregó 200µl de ³⁵S-metionina a una concentración de 50µCi/ml. A las horas post-infección establecidas se lavaron las monocapas 3 veces con PBS y se lisaron con 50 µl de tampón de carga de proteínas. 5 µl del lisado se analizó por SDS-PAGE 12%, los geles se secaron y se analizaron por medio de PhosphorImager (BioRad).

2.8. Análisis de la producción de dsRNA.

Placas de 24 pocillos con células MA104 GFP⁺ o MA104 CFP-NSP5⁺ fueron infectadas a la correspondiente MOI y fueron lisadas con 50 µl de tampón de lisis de RNA (10mM de Tris pH 7,5; 50mM de NaCl; 1% de Triton X-100) a los tiempos especificados previo lavado con PBS. Los lisados fueron clarificados a 5000 rpm por 10 minutos. Alícuotas de 200 µl del lisado fueron incubadas con 50 µl de solución de digestión 5X (0,28 M Tris pH 8,0, 80 mM EDTA, 1% SDS, 0,17 M β-mercaptoetanol, 0,7 M NaCl) y dos volúmenes de fenol:cloroformo (1:1), se agitó en vortex por 1 minuto y se centrifugó durante 10 minutos a 135000 rpm; la fase acuosa se precipitó con etanol durante toda la noche a -20°C. Posteriormente se centrifugó a 13.500 rpm durante 30 minutos a 4°C para obtener el dsRNA. Se eliminó el sobrenadante y una vez

seco el precipitado, se resuspendió en tampón de carga 2X (30% Glicerol, 0,25% Azul de bromofenol, 0,25 % Xilenocianol, Tris pH 6,8) y se analizó por PAGE al 7%. El gel fue sometido a tinción con nitrato de plata para ácidos nucleicos.

2.9. Ensayos de co-inmunoprecipitación.

2.9.1. Co-inmunoprecipitación de la DLP *in vivo*.

Inicialmente se preparó el complejo Anticuerpo-Proteína G incubando 1 µl de anticuerpo de cobayo anti-NSP5 con 50µl de una suspensión de 50% de sepharosa proteína G (AMERSHAM) en TNE. Se incubó 1 hora 45 min. en agitación y se resuspendió en el tampón de lisis correspondiente.

Placas de 10 cm de células MA104 transducidas con los vectores correspondientes, fueron infectadas a una MOI de 80 con virus marcado con ³⁵S-metionina en presencia de CHX. A las 2 h. p. i. se lisaron las células con 500µl de BLB (50 mM Tris pH 8, 125 mM de NaCl, 30 mM de KCl, 20mM de EDTA, 0,1% de Triton X-100, 0,05% de SDS y 2 µg/ml de aprotinina), a partir de este momento las muestras se mantuvieron en hielo, se clarificó a 10000g 15 min a 4°C y el sobrenadante se incubó con el complejo Anticuerpo-Prot. G por 16 horas a 4°C con agitación. Finalmente se realizaron 2 ciclos de lavado con BLB y centrifugación (2000g, 3 min a 4°C.). También se realizaron variantes a 3 h. p. i. con tampón de lisis BB (100 mM Tris pH 8, 250 mM de NaCl, 0.5 % de NP40 y 2 µg/ml de aprotinina).

2.9.2. Preparación de DLP.

Se infectaron células MA104 a una MOI de 10 y a las 20 h. p. i. las células se lisaron por congelamiento. El lisado se clarificó en tubos cónicos de 50 mL por 15 min. a 5000 rpm. Al sobrenadante se agregó EDTA a una concentración final de 50mM y se centrifugó a 6000 rpm por 16 h en una centrifuga SORVALL con un rotor GS48. Los pellet que contenían las DLPs se resuspendieron en TBS (25 mM Tris pH 7,5, 137 NaCl, 5 mM KCl, 0,5 mM de Mg₂Cl, 0,7 mM Ca₂Cl, 0,6mM Na₂PO₄H y 0,1% de glucosa) toda la noche a 4°C. Se realizó una gradiente de CsCl llevando a una densidad de 1.367g/ml. Se centrifugó en ultracentífuga (BECKMAN) 20 h a 33000 rpm usando un rotor 55 Ti. Se colectaron fracciones de 500 µl y se resolvieron en SDS-PAGE 12%. Las fracciones se analizaron por tinción de Azul de Coomassie y en el caso de los DLPs marcados con ³⁵S-metionina se analizaron por PhosphoImager.

Las fracciones que poseían DLPs se unificaron, se le agregó dos veces su volumen de TBS y se centrifugaron 1 hora y media a 13.500 rpm; el pellet se resuspendió en TBS.

2.9.3. Co-inmunoprecipitación de la DLP *in vitro*.

Placas de 10 cm de células MA104 transducidas con los vectores correspondientes, fueron lisadas con 500µl de BLB; a partir de este momento las muestras se mantuvieron en hielo, se clarificó a 10000g por 15 min a 4°C. 200µl del lisado se incubaron con 16µl de DLPs ³⁵S-metionina por 2 h a 4°C con agitación. Posteriormente se agregó el complejo Anticuerpo-Prot. G y se incubó 16 horas a 4°C con agitación. Finalmente se realizaron 2 ciclos de lavados con BLB y centrifugación

(2000g, 3 min a 4°C.). Además se realizó otro ensayo utilizando el tampón de lisis BB con una clarificación de 5 min a 5000 rpm.

2.10. Transcripción *in vitro*.

Placas de 10 cm de células MA104 transducidas con los vectores correspondientes, fueron lisadas con 500µl BB y se clarificó 5 min a 5000 rpm. En otro ensayo las células se resuspendieron en 500µl de tampón de transcripción BT (50mM de Tris pH 8, 50mM de NaCl, 10mM de MgCl₂ y 2 µg/ml de aprotinina), se colectaron las células con un “*scraper*” y se sonicó por 7s. El lisado se clarificó 10.000g 15 min a 4°C. Para el ensayo de transcripción se incubó 10 µl de los extractos con 10µl de los DLPs purificados toda la noche a 4°C en presencia de 100µM de CHX. Luego se agregó 80 µl de mix de transcripción. Se incubó 3 h a 42°C y se realizó una extracción fenol-cloroformo seguida por una precipitación con etanol. Las muestras secas se resuspendieron en 15 µl de tampón de carga formamida, se calentaron 10 min a 75°C y se resolvieron en PAGE 5% urea 8M.

2.11. Análisis de NSP5 por MS.

2.11.1. Purificación de NSP5.

Células MA104 fueron infectadas a una MOI 20, a las 6 h. p. i. (para los ensayos cinéticos se realizó a las 4, 6 y 10 h. p. i.) se lisaron las células con tampón BLB, se clarificaron las muestras 15 min a 10000 g, se agregó el complejo Anticuerpo-Prot. A, se incubó 16 horas a 4°C y se realizaron 2 ciclos de lavados con BLB y centrifugación

(2000g, 3 min. a 4°C). Posteriormente se resuspendió en 15 µl de tampón de carga de proteínas 2X (sin agentes reductores) y se calentó 3 min a 100°C. Las muestras se resolvieron en SDS-PAGE 10% y se tiñeron con azul de coomasie. Las bandas deseadas se cortaron y se guardaron a -20°C hasta ser analizadas.

Para los ensayos de co-inmunoprecipitación, se procedió de la misma manera salvo que se cortó todo el carril en pedazos de aproximadamente 0,2 cm de alto. Como controles se utilizaron extracto de células MA104 incubadas con sepharosa proteína A unida a anticuerpo anti-NSP5 y células infectadas incubadas con sepharosa proteína A sin anticuerpo.

2.11.2. Digestión con Proteasas.

Los fragmentos de geles fueron nuevamente cortados en pedazos pequeños, se incubaron con 100µl de tampón de lavado (Mezcla 1:1 de acetonitrilo y 50 mM Bicarbonato de amonio pH=7, 8), luego con 100 µl de Beq (50 mM Bicarbonato de amonio pH 7, 8) y se desecaron con 100µl de acetonitrilo (ACN) y luego 10 min en SpeedVac. En el caso de tripsina se preparó una mezcla de 40µl de Beq con 2 µl Stock Tripsina (PROMEGA) (20µg/100µl de 1mM de HCl) y se agregó 5,25µl de la mezcla a los pedazos de geles mas 10µl de Beq. Se incubó 16 h. a 37°C. En el caso de quimiotripsina se preparó una mezcla de 70µl de Beq. con 5 µl Stock Quimiotripsina (Boheringer) (25µg/50µl de 1mM de HCl) y se agregó 2µl de la mezcla a los pedazos de geles mas 13µl de Beq. Se incubó 20 h a 25°C. Para el caso de corte con Glu-C (MERCK) se agregó 10 µl de una solución 0,03µg/µl de Glu-C mas 10µl Beq. Se incubó 20hs a 26°C. En el caso de cortes múltiples se realizó inicialmente una digestión

típica con quimiotripsina por 18 h y luego se agregó 10 µl de una mezcla de 40µl de Beq con 2 µl Stock Tripsina (PROMEGA) y se incubó 6 h a 37°C. En todos los casos una vez terminada la digestión se agregó 10µl de 0,5 % de Acido trifluoro acético (TFA) en ACN y se incubó 10 min en sonicador a maxima intensidad. El sobrenadante se pasó a un tubo de muestra para LC-QToF. Los pedazos se lavaron con 10µl de ACN y se le agregó al tubo de muestra. Las muestras se desecaron en SpeedVac 10 min y los péptidos se resuspendieron en 6µl de 5% ACN en, 1% de TFA.

En algunos casos se realizó, previa a la digestión con proteasas, una reducción de la muestra con 60µl de una solución de DTT 10mM por 45 min a 46°C y una alquilación con 60 µl de Iodoacetamida 55mM por 20 min en oscuridad a temperatura ambiente. Se lavaron los geles con 100 µl de tampón de lavado y se desecaron con 100µl de ACN y por 10 min en SpeedVac. Posteriormente se continuó con la digestión de proteínas.

Para los ensayos de co-inmunoprecipitación, los pedazos de geles se digirieron con tripsina según el protocolo descrito anteriormente.

2.11.3. Análisis de péptidos e interpretación de datos.

Diferentes volúmenes de los péptidos fueron analizados por nanoLC ESI MS/MS con el equipo Q-Tof Ultima (Micromass, Manchester, UK) bajo diferentes condiciones. Para la identificación de las modificaciones de NSP5 se analizaron los espectros MS/MS con el servidor MASCOT (version 1.9, Matrix Science Ltd, London, UK) contra la base de datos SwissProt, los sitios de fosforilación fueron identificados utilizando el programa MASSLINX.

Para los ensayos de cuantificación los péptidos identificados se calculó la intensidad de los iones extraídos del cromatograma (extracted ion chromatogram technique) utilizando el programa MASSLINX.

RESULTADOS

3.1. Expresión en *trans* de NSP5, interferencia de NSP5 y ensayos de trans-complementación.

Como se mencionó en la introducción, en una primera instancia se decidió realizar un método de trans-complementación, para ello se procedió a expresar trNSP5u (mutante resistente al siRNA) en células MA104 con un vector lentiviral; en la Figura 5a se observa la expresión de la proteína trNSP5u por inmunofluorescencia indirecta (IFI). Además, se realizaron los ensayos de inhibición de la expresión de la NSP5 viral por siRNA; en la Figura 5b se observa la inhibición en la expresión de NSP5 mediada por siRNA; como marcador de infección se observó la expresión de VP6 por IFI. Es de notar que en algunas células tratadas con siRNA se observa la expresión de VP6 independiente de la presencia de NSP5, demostrando que se ha producido infección por Rotavirus y que el efecto del siRNA es específico sobre NSP5.

Posteriormente se realizaron los ensayos de trans-complementación utilizando como marcador de este efecto la lisis celular mediada por Rotavirus. En la Figura 6 se puede observar en el pocillo de la derecha el efecto lítico del Rotavirus sobre las células MA104 y en el pocillo de la izquierda el efecto protector del siRNA sobre la lisis debido a una inhibición de la expresión de NSP5. Al trans-complementar con trNSP5u se observa una reconstitución parcial de la infección (pocillo del medio).

Ante esta situación y a fin de dilucidar la tasa de trans-complementación, se procedió a cuantificar el número de células trans-complementadas. Para ello, se realizó un ensayo en el que se cuantificó el número de células que expresaban NSP5 por IFI y el

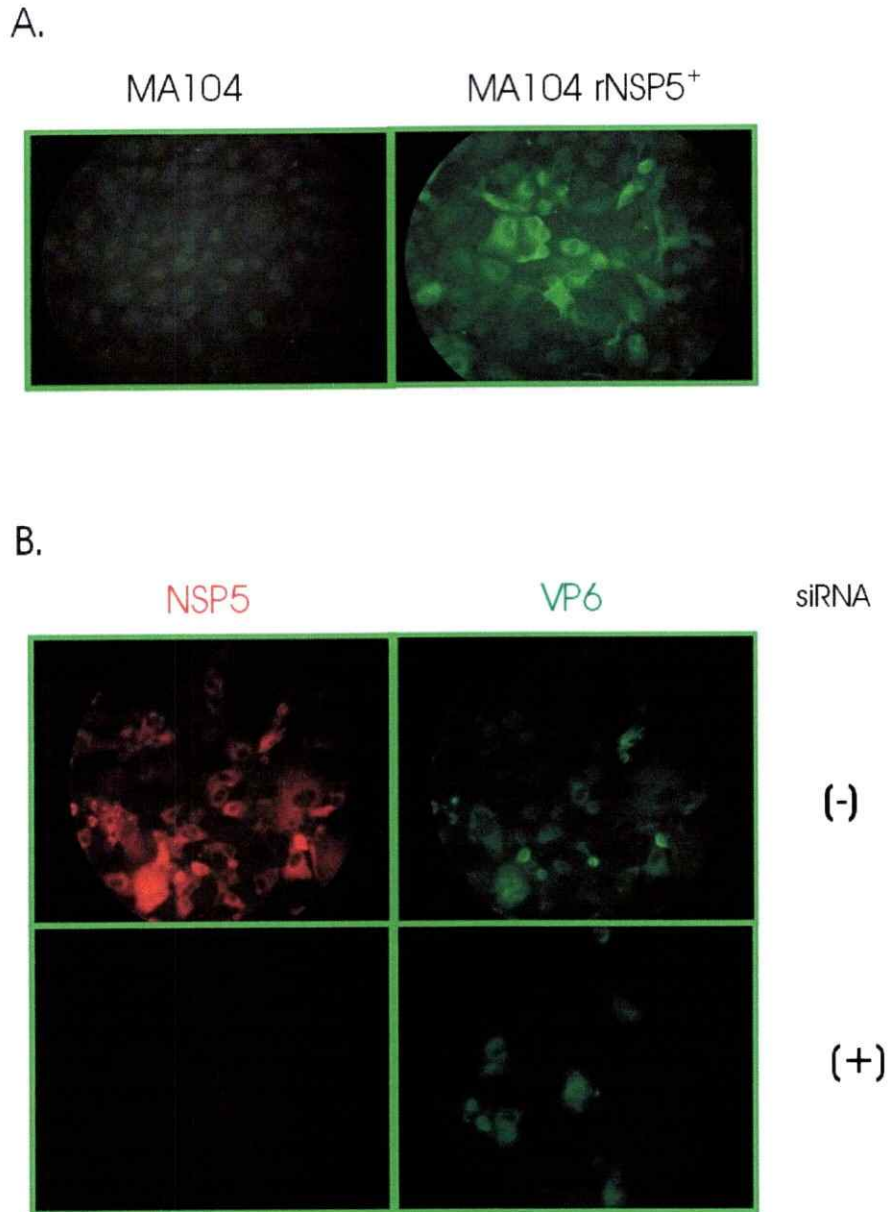


Figura 5. Expresión de trNSP5 y efecto del siRNA sobre la infección por Rotavirus. (A) Células MA104 fueron transducidas con el vector lentiviral, 72 horas post-transducción las células fueron fijadas con PFA y analizada la expresión de NSP5 por IFI con un anticuerpo secundario marcado con Alexa 488. (B) Células MA104 fueron transfectadas con siRNA para luego ser infectadas con la cepa SA11, 7 h. p. i. las células fueron fijadas con PFA. La expresión de las proteínas virales fue analizada por IFI en el caso de NSP5 se utilizó un anticuerpo secundario marcado con Rodamina (rojo) y en el caso de VP6 un anticuerpo secundario marcado con Alexa 488 (verde); los paneles superiores muestran un control sin siRNA.

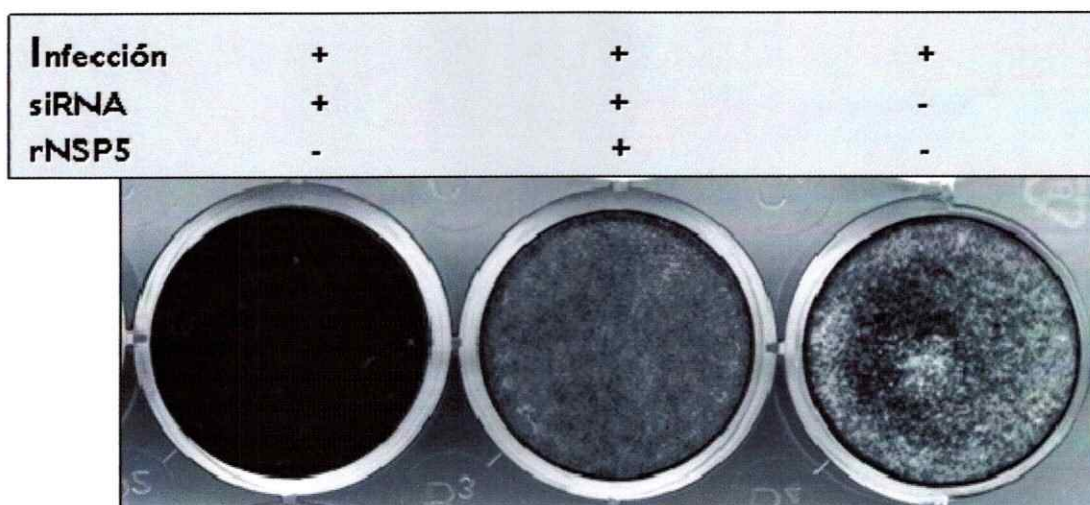


Figura 6. Trans-complementación de NSP5. Células MA104 fueron transducidas con NSP5, 60 horas post transducción las células fueron transfectadas con siRNA para luego ser infectadas con Rotavirus a las 72 horas post-transducción. A las 24 horas post-infección las células fueron fijadas y teñidas para determinar lisis celular.

número de células infectadas, utilizando la proteína viral VP2 como marcador de infección. Debido a que la tasa de transducción en los ensayos previos no fue de un 100% se realizó un control de células solo transducidas; de esta forma pudo estimarse la tasa de transducción en un 45% (Tabla 2, lámina 1 “transducidas”). Además se realizó un control de infección donde se observó una tasa de infección de un 100% (Tabla 2, lámina 2 “infectadas”). Por último se realizó un control del efecto del siRNA, donde células infectadas fueron tratadas con siRNA, se observó un 40,4% de células infectadas y considerando el 100% de infección observado anteriormente se calculó la tasa de interferencia (59,6%) (Tabla 2, lámina 3 “infectadas e interferidas”).

Con los resultados obtenidos en los controles es posible calcular el porcentaje esperado de células infectadas si consideramos un 100% de trans-complementación. La probabilidad de que una célula sea infectada, interferida y exprese trNSP5u esta dada por la siguiente fórmula: %células transducidas x %células interferidas / 100 ($45,0 \times 59,6 / 100 = 26,8\%$), a este resultado debe sumársele las células no interferidas, las cuales representan un porcentaje basal de infección (40,4%), es así que el porcentaje esperado de infección en el caso de un 100% de trans-complementación es de un 67,2%. Sin embargo, se observó sólo un 51,5% de células infectadas en el ensayo de trans-complementación (Tabla 2, lámina 4 “transducida, infectada e interferida”). Al restar el porcentaje basal de infección a los porcentajes observado y esperado, para luego obtener la razón entre ambos permite concluir que un 41% de las células interferidas que expresaban trNSP5u desarrollaron infección (tasa de trans-complementación), por lo que un 59% de las células que expresaban trNSP5u fueron resistentes a la infección.

Tabla 2. Cuantificación por inmunofluorescencia de la tasa de trans-complementación de NSP5.

| Lámina | % Transducción | % Interferencia | % Células Infectadas | | % Trans-complementación |
|---|-------------------|--------------------|----------------------|------------------------|----------------------------|
| | | | Observadas | Esperadas ^a | |
| 1)Transducida | 45,0 | | | | |
| 2)Infectada | | | 100 | | |
| 3)Infectada Interferida | | 59,6 | 40,4 | | |
| 4)Transducida Infectada Interferida | | | 51,5 | 67,2 | 41,4 |

^aEl cálculo se realizó utilizando la siguiente fórmula: (%células transducidas x %células interferidas)/100 + %células no interferidas.

Este ensayo es representativo de varias réplicas en donde pese a observarse resultados disímiles en los porcentajes de transducción e interferencia, se observaron tasas de trans-complementación semejantes.

3.2. La expresión en *trans* de NSP5 inhibe la producción de partículas virales.

Los datos obtenidos en la Figura 6 y la Tabla 2 suponen un efecto inhibitorio de trNSP5 sobre la infección viral, por lo que decidimos ensayar esa hipótesis. Para ello observamos el efecto de la expresión en *trans* de trNSP5 sobre la formación de nuevas partículas virales. Células MA104 y MA104 NSP5⁺ fueron infectadas y los virus obtenidos en cada tipo celular fueron cuantificados por medio de un ensayo de formación de placas de lisis.

En la Figura 7 se observa como la presencia de trNSP5 previa a la infección, inhibe la formación de nuevas partículas. En la Figura 7a se muestra un ensayo típico de cuantificación por formación de placa de lisis. En este ensayo los inóculos virales provenientes de la infección en cada tipo celular se diluyen de 10 en 10 y se procede a infectar monocapas de células MA104, manteniendo las células en un medio semisólido. La formación de un foco de lisis corresponde a un clon viral; se puede observar como los sobrenadantes de células NSP5⁺ presentan un menor número de focos de lisis que el control correspondiente. En la Figura 7b se observa la cuantificación de este estudio, donde la expresión en *trans* de trNSP5 produce una disminución de alrededor de un 30% en la producción de nuevas partículas virales.

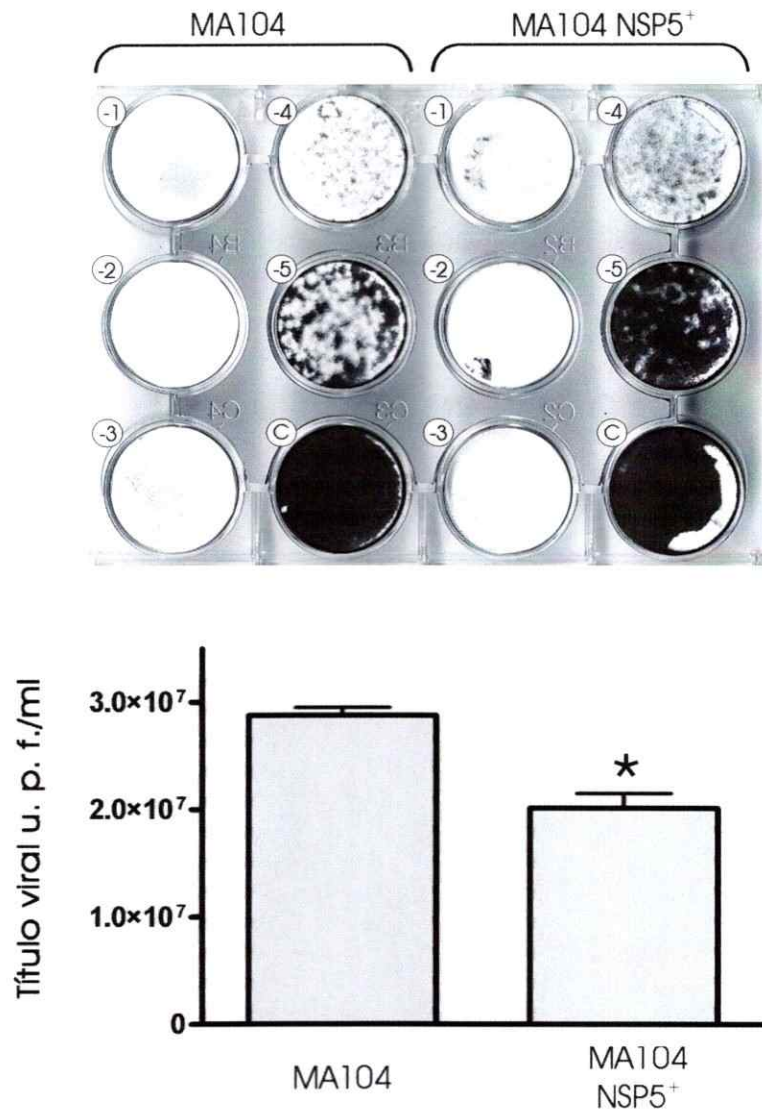
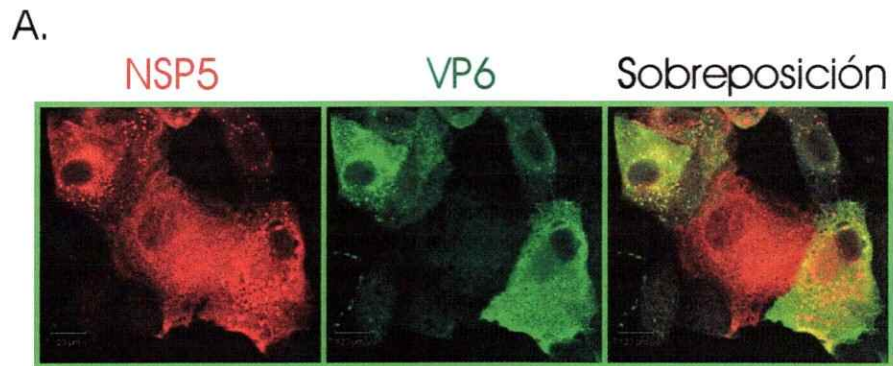


Figura 7. Efecto inhibitorio de NSP5 sobre la formación de partículas infectivas de Rotavirus. (A) Células MA104 y MA104 transducidas con el vector lentiviral (MA104 NSP5⁺) fueron infectadas con Rotavirus a una MOI de 2. Los virus producidos en cada tipo celular fueron cuantificados por el ensayo de formación de placa de lisis en células MA104. Los números al lado de cada pocillo corresponden a la dilución del inóculo viral. (B) Cuantificación de los resultados obtenidos en A; * $p < 0,05$.

3.3. La expresión en *trans* de NSP5 la inhibe formación de viroplasmata.

Habiendo establecido de que la expresión en *trans* de NSP5 provoca un efecto inhibitorio en la infección, decidimos analizar el mecanismo por el cual trNSP5 afecta el ciclo viral. Sabiendo que trNSP5 afecta la síntesis de nuevas partículas, analizamos una etapa previa en el ciclo viral, la replicación. Como se mencionó anteriormente este proceso ocurre en estructuras visibles al microscopio óptico denominadas viroplasmata, por lo que decidimos usar la formación de estas estructuras como parámetro de replicación.

Para ello, se procedió a cuantificar por IFI el número de células que expresaban trNSP5 y además eran refractarias a la infección. En la Figura 8a se observa una imagen de microscopía confocal representativa del ensayo, donde NSP5 se marcó de color rojo y VP6 de color verde, esta última proteína se utilizó no sólo como marcador de infección, sino también debido a su capacidad de ser incorporada a los viroplasmata. Se puede observar como las células que expresan VP6 (VP6⁺) necesariamente expresan NSP5, esto se debe a que nuestro ensayo no diferencia NSP5 de trNSP5. Las células que no expresan VP6 (VP6⁻) no presentan ciclo viral y pueden ser NSP5⁺ o NSP5⁻. Cabe destacar que todas las células VP6⁺ presentaban viroplasmata. En la Figura 8b se observa la cuantificación de las proporciones para los diferentes tipos celulares. El porcentaje de células VP6⁺/NSP5⁺ fue de un 100 % en el control infectado sin transducir (Figura 8b lámina "infectada"), mientras que en las células infectadas y transducidas fue de un 91 % (Figura 8b lámina "infectada transducida"). Llama la atención el hecho que todas las



B.

| Lamina | Fenotipo | | |
|----------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| | NSP5 ⁻ /VP6 ⁻ | NSP5 ⁺ /VP6 ⁺ | NSP5 ⁺ /VP6 ⁻ |
| Transducidas | 82,4% | 0% | 17,4% |
| Infectadas | 0% | 100% | 0% |
| Transducidas Infectadas | 0% | 91% | 9% |

Figura 8. Efecto inhibitorio de NSP5 sobre la formación de viroplasmias. (A) Células MA104 fueron transducidas y posteriormente infectadas con Rotavirus a una MOI de 2 ufp/cél. A las 7 h. p. i. fueron fijadas con PFA y se realizó IFI contra NSP5 (anticuerpo secundario marcado con Rodamina) y contra VP6 (marcador de infección) (anticuerpo secundario marcado con Alexa 488). (B) Cuantificación del experimento A con sus respectivos controles.

células VP6⁻ (9%) eran NSP5⁺, sobretodo si consideramos que en el control paralelo sin infectar 1 de cada 6 células (17,4%) eran NSP5⁺ (Figura 8b lámina “transducida”) Con estos datos calculamos la tasa de inhibición de la infección en un 51% (9%/17,4%).

De esta forma se puede concluir que la expresión de trNSP5 previa a la infección posee un efecto negativo sobre la replicación de Rotavirus. Este resultado es concordante con los obtenidos en los experimentos de trans-complementación donde la tasa de trans-complementación fue estimada en un 41%.

Se realizaron varias réplicas del ensayo, sin embargo debido a la variación en la tasa de transducción no fue posible calcular desviaciones estándar para el experimento. Cabe destacar que todos los ensayos presentaron tasas de inhibición semejantes.

Notablemente en las células que expresaban trNSP5 y fueron resistentes a la infección no se observó, por IFI, la expresión de la proteína viral VP6, sugiriendo un efecto de trNSP5 sobre la expresión de las proteínas virales. Este ensayo se realizó a las 6 h. p. i. donde normalmente ya ha ocurrido la segunda ola de transcripción. Por lo tanto, este efecto pudo deberse a la inhibición de la replicación y por ende la formación de nuevas DLPs responsables de la segunda ola de transcripción. Sin embargo, en la Figura 3b, donde se grafica la inhibición de NSP5 por siRNA, se puede observar por IFI la expresión de VP6 en ausencia de la segunda ola de transcripción (NSP5 y los viroplasmos son esenciales para la síntesis de nuevas DLPs). La VP6 observada en este ensayo probablemente provenga de la traducción de los mensajeros producidos por

DLP-PP. Estos antecedentes presumen una acción inhibitoria de trNSP5 en momentos tempranos del ciclo viral.

3.4. CFP-NSP5 se incorpora a los viroplasmos y forma agregados dependientes de la infección.

Como se mencionó anteriormente, los estudios de IFI descritos en la sección 3.3 nos permitieron cuantificar en forma indirecta el número de células NSP5⁺ que fueron susceptibles a infección, ya que el sistema utilizado no permitía discriminar el origen de NSP5 en las células infectadas, ya sea del suministro en *trans* o de la infección. Esto no nos permitía determinar cualquier estado intermedio en la formación de viroplasmos mediado por la trNSP5.

A fin poder discriminar entre la trNSP5 y la NSP5 producida durante la infección, se construyó una proteína de fusión donde la proteína fluorescente Cian (cyan fluorescence protein -CFP-) se fusionó al extremo amino terminal de NSP5 (CFP-NSP5). Tal como se observa en la Figura 9 panel inferior (flecha de color amarillo), esta proteína es incorporada a los viroplasmos durante la infección y por ende nos permite determinar la formación de viroplasmos en células CFP-NSP5⁺. A causa de este efecto CFP-NSP5 se encuentra concentrada en los viroplasmos en células infectadas por lo que aparenta una menor expresión que la observada en el control sin infectar, donde se encuentra difusa en la célula, sin embargo esto es un efecto óptico ya que en ambas condiciones se expresan iguales cantidades de CFP-NSP5. En todos los ensayos se observó una tasa de expresión para esta proteína de un 80% a un 100%,

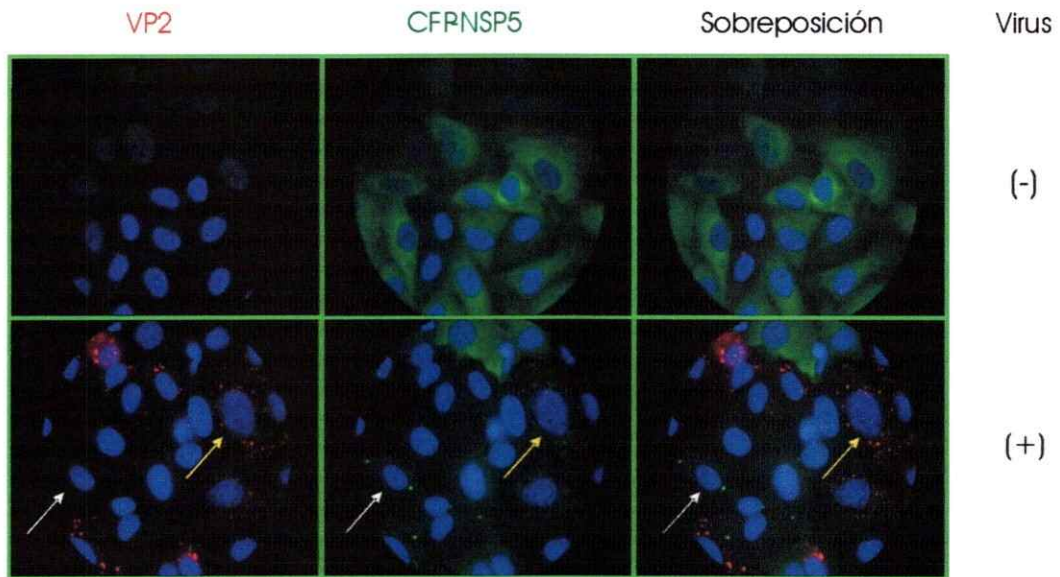


Figura 9. Expresión y formación de agregados de CFP-NSP5. Células MA104 fueron transducidas con CFP-NSP5 (la cual se observa de color verde) y posteriormente infectadas por Rotavirus, 7 h p. i. las células fueron fijadas con PFA y se analizó la expresión de VP2 (utilizada como marcador de infección y de viroplasmias) por IFI (anticuerpo secundario marcado con Rodamina). Como control se utilizaron células transducidas con CFP-NSP5 sin infectar. Con flechas blancas se señalan los agregados de CFP-NSP5 y con flechas amarillas los viroplasmias.

considerablemente alta para el modelo MA104. La incorporación de proteínas de fusión de NSP5 a viroplasmos fue descrito anteriormente, en construcciones semejantes a CFP-NSP5 (Eichwald et al., 2004b).

El uso de VP2 como marcador de infección permitió identificar tres tipos celulares: las que presentan una distribución difusa de CFP-NSP5 (células sin infectar), las que presentan agregados de CFP-NSP5 en presencia de VP2 (viroplasmos) (panel inferior, flecha amarilla) y un tipo celular novedoso que formaban agregados de CFP-NSP5 sin VP2 (panel inferior, flecha blanca), presumiblemente estas células presentan una infección abortiva pues sólo se observan en las monocapas que han sido sometidas a infección. Se ha observado la formación de agregados en construcciones similares de GFP-NSP5 (Mohan et al., 2003), pero esto ocurre en forma independiente de la infección.

Nuevamente la falta de expresión de proteínas virales (visibles por IFI) supone un efecto de CFP-NSP5 temprano en la infección, por lo que la posible dependencia de la DLP en la formación de estos agregados será estudiada con mayor profundidad en la sección 3.10.

3.5. CFP-NSP5 inhibe la formación de partículas virales y viroplasmos.

A fin de corroborar los resultados observados sobre la formación de partículas virales, decidimos realizar un ensayo con células CFP-NSP5⁺, semejante al realizado en la sección 3.2. Como control se utilizaron células que expresen la proteína GFP. Es de notar que CFP se diferencia de GFP por 6 sustituciones, las cuales se encuentran

distribuidas en el interior de la molécula por lo que no es de esperar que afecte significativamente su uso como control.

Como se observa en la Figura 10a CFP-NSP5 posee un efecto inhibitorio sobre la producción de partículas virales, el cual es independiente de la proteína de fusión, ya que GFP no presenta ningún efecto. La inhibición es considerablemente mayor que la producida por trNSP5, alcanzando una disminución de casi 1 log en el título viral. Este aumento en el efecto inhibitorio puede deberse, por lo menos en parte, a la mayor tasa de transducción obtenida con el vector CFP-NSP5.

Una vez determinado el efecto inhibitorio de CFP-NSP5 sobre la producción de partículas, se procedió a cuantificar la tasa de células CFP-NSP5⁺ susceptibles a la infección. Para ello se realizó un ensayo de IFI semejante al realizado en la Figura 8 donde se utilizó la fluorescencia de CFP-NSP5 para identificar la incorporación de la proteína a los viroplasmos y como marcador de infección a la proteína VP2. Como criterio de infección se utilizó la formación de viroplasmos y la expresión de VP2.

En la Figura 10b se grafica la cuantificación de este estudio. Se observa como la presencia de CFP-NSP5 tiene un efecto negativo sobre la infección por Rotavirus, identificándose solo un 14% de células con viroplasmos; nuevamente este efecto fue considerablemente mayor que el de trNSP5. Además se pudo observar un 11% de células que formaban agregados de CFP-NSP5.

En el control de células GFP⁺ no se observaron ni la formación de agregados fluorescentes ni células resistentes a la infección, demostrando que el efecto observado se debe a NSP5 y no a la proteína CFP.

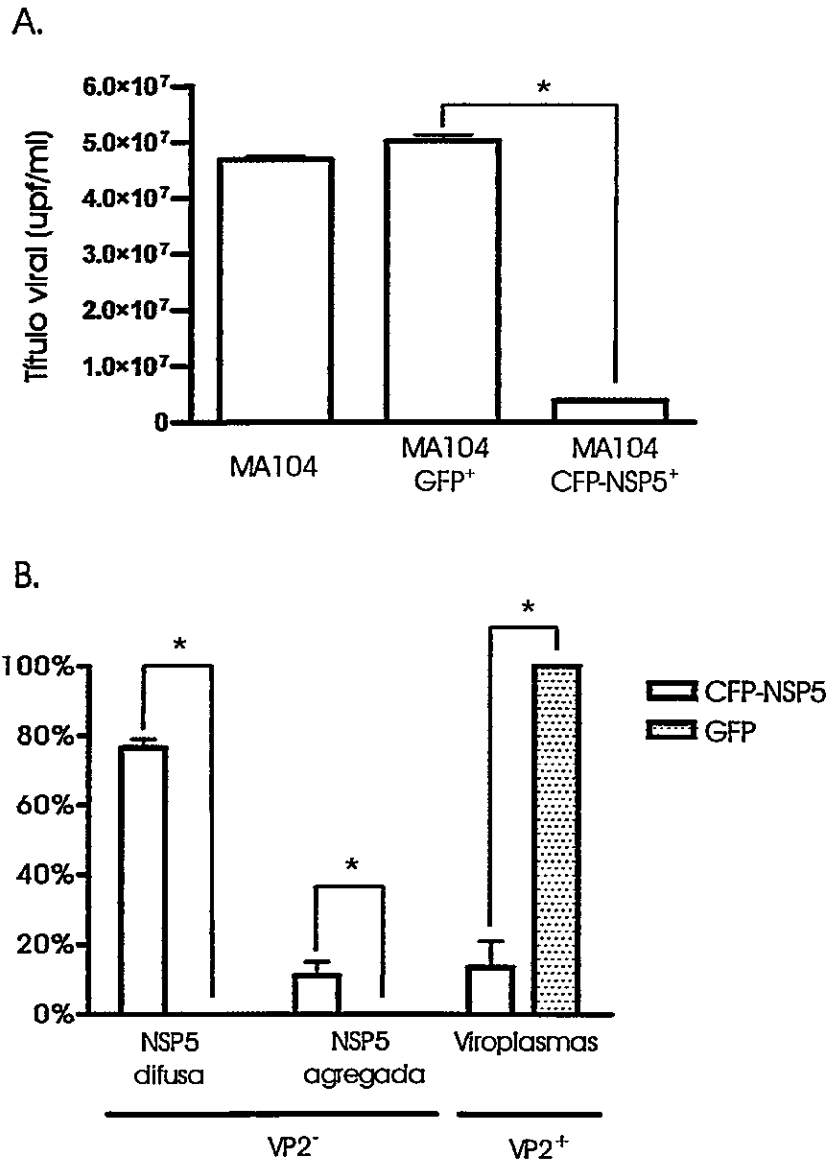


Figura 10. Efecto de CFP-NSP5 sobre la producción de partículas y la formación de viroplasmata. (A) Células MA104 fueron transducidas con el vector GFP o CFP-NSP5 y a las 72 horas post-transducción infectadas con Rotavirus a una MOI de 2. Además como control se utilizó células MA104. Los virus producidos en cada tipo celular fueron colectados y cuantificados por el ensayo de formación de placa de lisis en células MA104; * $p < 0,05$. (B) Células MA104 fueron transducidas con el correspondiente vector lentiviral. Posteriormente fueron infectadas con Rotavirus a una MOI de 3 y a las 7 h. p. i. las células fueron fijadas con PFA. Se analizó la expresión de CFP-NSP5 o GFP y por IFI la expresión de VP2 (utilizado como marcador de infección y de formación de viroplasmata). Posteriormente se cuantificó el número de células CFP-NSP5 o GFP que expresaban VP2 y formaban viroplasmata. Además se cuantificó el número de células que formaban agregados; * $p < 0,05$.

3.6. El efecto inhibitorio de NSP5 es revertido por un aumento en la MOI.

Los resultados observados en los experimentos de inmunofluorescencia en donde ambas proteínas fueron capaces de inhibir la expresión proteica, sugieren que el efecto inhibitorio debe ocurrir temprano durante la infección. Considerando que el principal actor a momentos tempranos es la DLP-PP, decidimos ensayar cual era el efecto de un aumento de la DLP-PP sobre el efecto inhibitorio de trNSP5.

Para ello, se realizaron infecciones con concentraciones crecientes de virus (los cuales una vez dentro de la célula se convierten en DLPs) en células que expresan GFP o CFP-NSP5, se realizó un ensayo de IFI utilizando la expresión de VP2 como marcador de infección (Fig. 11a.).

En la Figura 11b se grafican los resultados obtenidos, se observa como el aumento en la MOI efectivamente es capaz de revertir parcialmente el efecto inhibitorio de CFP-NSP5. Sorprendentemente, se observó un comportamiento relativamente lineal, tanto para el aumento de células CFP-NSP5 infectadas (r^2 0,9078) como para la disminución de células CFP-NSP5 resistentes a la infección (r^2 0,9717). Es de notar que la formación de agregados no varió significativamente, observándose solo un leve aumento a MOI 15.

Siendo el viroplasma el sitio de síntesis del dsRNA, decidimos corroborar los resultados observados anteriormente, analizando el efecto de CFP-NSP5 sobre la síntesis del dsRNA. Para ello se infectaron células MA104 que expresaban GFP y CFP-NSP5 a una MOI de 3 y de 15, y se analizó la síntesis de dsRNA a diferentes tiempos post-infección (Fig. 12). Los tiempos seleccionados permiten analizar diferentes etapas de la

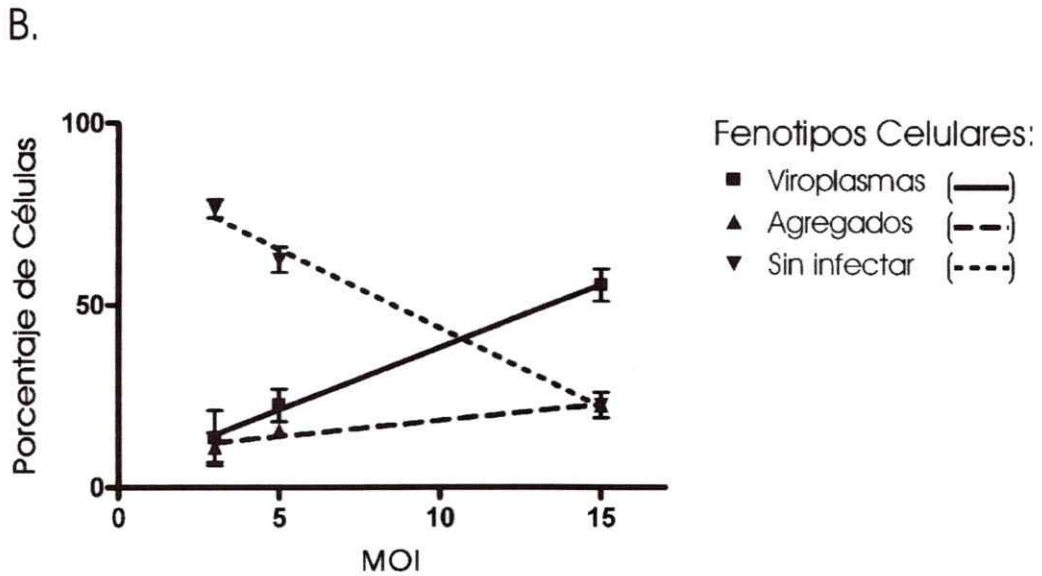
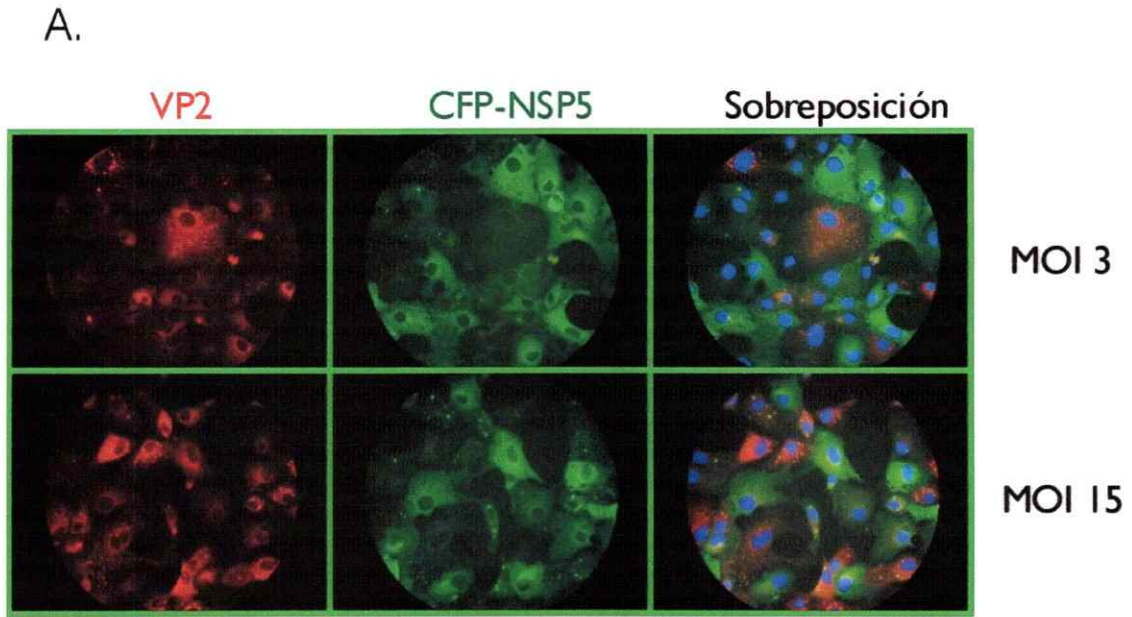


Figura 11. Efecto inhibitorio de CFP-NSP5 es revertido por un aumento de la MOI. (A) Células MA104 fueron transducidas con el vector CFP-NSP5 e infectadas a la correspondiente MOI, 7 h p. i. las células fueron fijadas con PFA y se analizó la expresión de VP2 por IFI. (B) Cuantificación de los diferentes fenotipos celulares. Como control se utilizó células MA104 transducidas con GFP la cual presentó 100% de infección para todas las MOI (datos no mostrados).

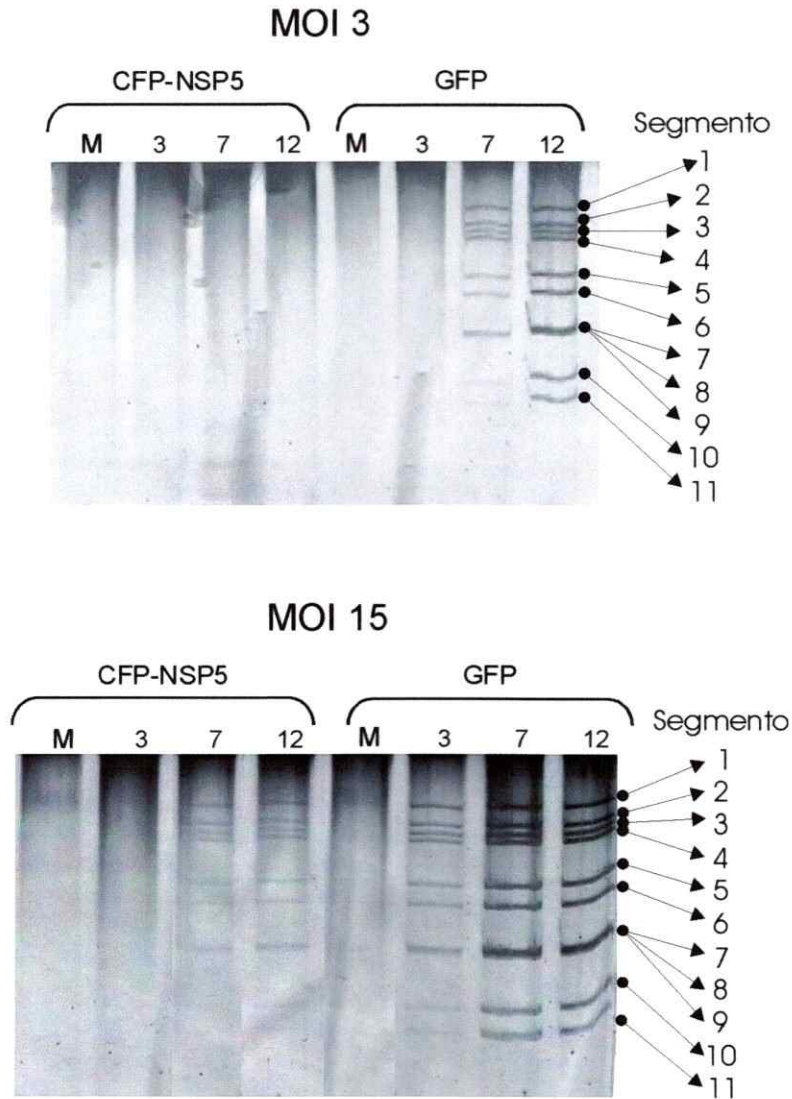


Figura 12. Efecto de CFP-NSP5 sobre la producción dsRNA. Células MA104 fueron transducidas con el correspondiente vector y posteriormente infectadas con la correspondiente MOI, a la h. p. i. establecida se lisaron las células y el dsRNA se obtuvo por extracción fenol-cloroformo. Las muestras se resolvieron en gel de acrilamida 7% y se reveló con tinción con plata. Se identifican con flechas los segmentos de dsRNA correspondientes al genoma viral.

infección. A las 3 h. p. i. ocurre predominantemente la transcripción y traducción de los mensajeros virales, además no se observa producción de dsRNA (Stacy-Phipps y Patton, 1987), a las 7 h.p.i. ocurre la mayor formación de viroplasmias y a las 12 h. p. i. ocurre la mayor producción de dsRNA (Estes, 2001).

La alta tasa de transducción observada para CFP-NSP5, alrededor de un 90% en el ensayo mencionado, permite descartar un efecto sobre la síntesis de dsRNA de las células no transducidas

Se observó, tal como era esperado, una menor cantidad de dsRNA en las células CFP-NSP5⁺. Nuevamente el efecto inhibitorio fue revertido parcialmente con un aumento en MOI; es interesante notar que no se observó una correlación directa con los resultados obtenidos en el experimento anterior ya que a una MOI de 15, el número de células infectadas aumentó de un 14% a un 65%, no observándose un aumento concordante en las cantidades de dsRNA.

3.7. La expresión en *trans* de NSP5 inhibe la síntesis de proteínas virales.

Los resultados obtenidos en los ensayos de inmunofluorescencia suponen un efecto de trNSP5 sobre la síntesis proteica (sección 3.3), por lo cual decidimos evaluar el efecto de trNSP5 y CFP-NSP5 sobre la síntesis de proteínas virales. Para ello se realizó un ensayo semejante al anterior donde se infectaron con una MOI de 3 y de 15 células que expresaban GFP o CFP-NSP5, luego se procedió a realizar marcaje de proteínas con ³⁵S-metionina y las muestras se colectaron a los mismos tiempos que en el apartado anterior.

Como se observa en la Figura 13, la presencia de CFP-NSP5 disminuye la producción de proteínas virales a los diferentes tiempos de infección. Es interesante notar que este efecto se repite a las 3 h. p. i. donde la mayor parte de los mRNAs son producidos por la DLP-PP (Lopez et al., 2005).

Estos resultados ratifican que el efecto inhibitorio de NSP5 ocurre en momentos tempranos de la infección, probablemente involucrando a la partícula primigenia o sus productos. Nuevamente este efecto es revertido parcialmente al aumentar la MOI.

3.8. NSP5 no interacciona con la DLP.

Tal como se ha mencionado en la introducción, se ha propuesto que la producción de los RNAs⁺ a ser utilizados como templado para la síntesis del dsRNA ocurre en los viroplasmatas (Silvestri et al., 2004), por lo que la DLP, al ser la única fuente de RNAs⁺, debe ser parte activa de estas estructuras. NSP5 es parte de los viroplasmatas, es esencial para la replicación y es capaz de interactuar con componentes de la DLP, por lo que surge la pregunta: ¿NSP5 es la responsable de reclutar a la DLP al viroplasma?

Considerando este escenario, la presencia previa de trNSP5 (debido a su expresión en *trans*) a la infección induciría una interacción inmediata con la DLP, no permitiendo el primer pulso de transcripción. Esto provocaría un efecto semejante al observado con trNSP5 y CFP-NSP5 inhibiendo la producción de proteínas a tiempos tempranos. Además un aumento en la cantidad de DLP (aumento de MOI) aumentaría la probabilidad de que algunas DLPs escapen a la interacción con NSP5 produciendo una

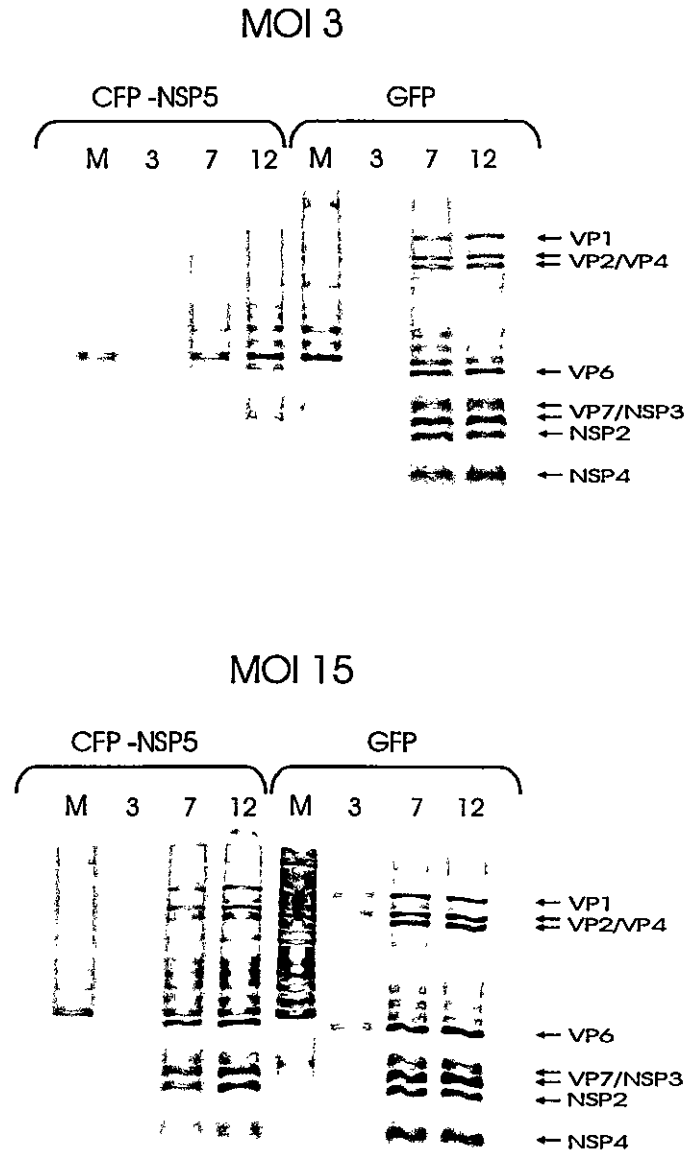


Figura 13. Efecto de CFP-NSP5 sobre la producción de proteínas virales. Células MA104 fueron transducidas con el correspondiente vector y posteriormente infectadas a la correspondiente MOI. A las 2 h. p. i. se agregó 50 μ Ci/ml de 35 S-metionina, a la hora indicada se lisaron las células, se resolvió en gel de acrilamida y se reveló en PhosphoImager; M: células sin infectar.

cantidad de mRNAs y por ende de proteína que pueda revertir parcialmente el efecto inhibitorio.

Basados en esa hipótesis, decidimos estudiar la posible interacción de la DLP con trNSP5 o CFP-NSP5. En una primera instancia se realizó un ensayo de co-inmunoprecipitación de la partícula entrante marcada con ^{35}S -metionina. Para ello se procedió a producir virus marcado en presencia de ^{35}S -metionina; luego se infectaron monocapas de células que expresaban GFP, NSP5 o CFP-NSP5 con estos virus marcados. Se realizó un ensayo de co-precipitación, con un anticuerpo anti-NSP5 en presencia de cicloheximida (CHX), inhibidor de traducción que evita la expresión de proteínas virales *de novo* que interfieran el experimento. Como control y a fin de determinar la unión inespecífica a la matriz se realizaron para cada tipo celular los ensayos en presencia o ausencia de anticuerpo.

Tal como se muestra en la Figura 14 no se observó una co-precipitación de la DLP en presencia de NSP5 o sus variantes. En el lisado celular utilizado para realizar la co-precipitación se encuentran las proteínas estructurales virales, lo que evidencia por lo menos la presencia de DLP marcada en la célula. Cabe destacar que este experimento se repitió bajo diferentes condiciones (entre ellas en ausencia de CHX), no observándose co-precipitación.

A fin de corroborar este resultado diseñamos un experimento *in vitro*, el cual nos permitió utilizar cantidades controladas de DLPs. Se incubaron extractos de células GFP⁺, NSP5⁺ y CFP-NSP5⁺ con DLPs purificadas marcadas con ^{35}S -metionina. Posteriormente, se realizó un ensayo co-inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-NSP5.

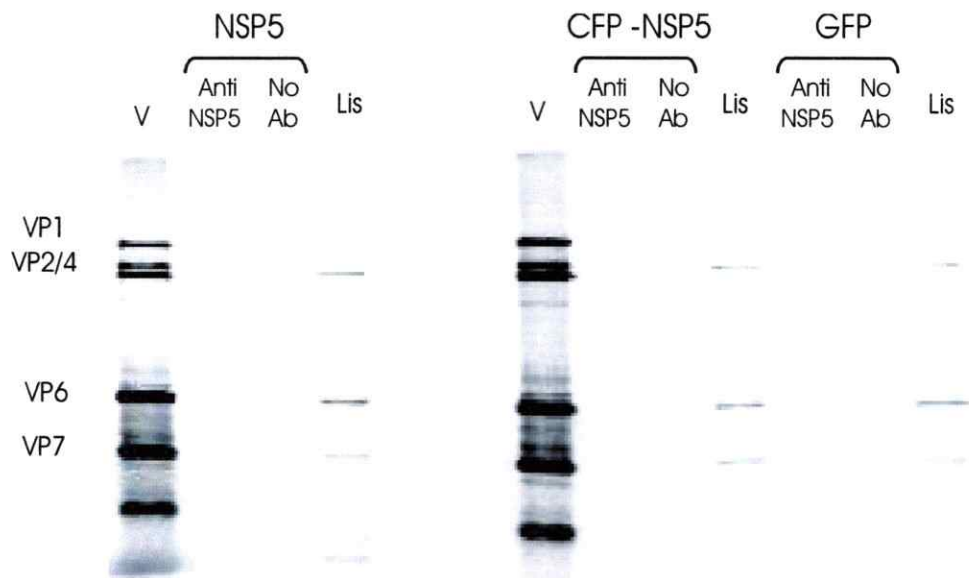


Figura 14. Co-precipitación de partícula entrante. Células MA104 fueron transducidas con el correspondiente vector lentiviral, se realizó un tratamiento con CHX 100 μ M 1 hora previa y durante la infección. Se infectó a una MOI de 80 con virus marcado con metionina, 2 h. p. i. se lisaron las células y se realizó un ensayo de co-precipitación del virus marcado con un anticuerpo anti NSP5. No Ab: proteína G sin anticuerpo; Anti NSP5: complejo anticuerpo-proteína G; Lis: extracto previo a la co-precipitación; V:virus marcado.

En la Figura 15 se observan los resultados obtenidos en el ensayo de co-precipitación. Coincidiendo con el resultado anterior no se observa una co-precipitación entre NSP5 o CFP-NSP5 y la DLP marcada.

3.9. NSP5 no afecta la actividad transcripcional de la DLP *in vitro*.

Considerando los resultados obtenidos en el apartado anterior, uno de los posibles mecanismos inhibitorios de trNSP5 es afectar la actividad transcripcional de la DLP. A fin de ensayar esta hipótesis, se realizaron ensayos de transcripción *in vitro* de DLPs en presencia de extractos celulares GFP⁺ o CFP-NSP5⁺. Los extractos celulares fueron incubados toda la noche con DLPs purificadas, se realizó un ensayo de transcripción *in vitro* y los RNAs⁺ fueron resueltos en geles 5% de acrilamida en condiciones denaturantes y revelados por tinción con plata. Como se muestra en la Figura 16 no se observó diferencias en la actividad de transcripcional de la DLP en ausencia o presencia de CFP-NSP5. Es de notar que estos experimentos se realizaron varias veces con diferentes condiciones de lisis observándose el mismo resultado.

3.10. La expresión proteica es necesaria para la formación de agregados de CFP-NSP5.

En la sección 3.4 se pudo observar la formación de agregados de CFP-NSP5, inducida por la presencia viral. A fin de determinar si la sola presencia de la DLP es capaz de inducir la formación de agregados de CFP-NSP5 se procedió a analizar la

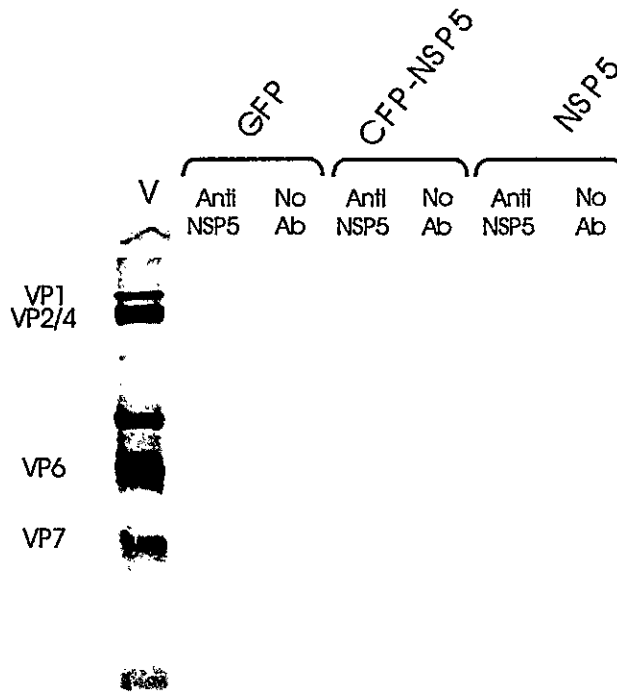


Figura 15. Co-precipitación de la DLP *in vitro*. Células MA104 fueron transducidas con el correspondiente vector lentiviral, posteriormente se incubó alícuotas de los extractos con DLPs marcados con ^{35}S metionina, se realizó un ensayo de co-precipitación del virus marcado con un anticuerpo anti NSP5. No Ab: proteína G sin anticuerpo; Anti NSP5: complejo anticuerpo-proteína G; V: virus marcado.

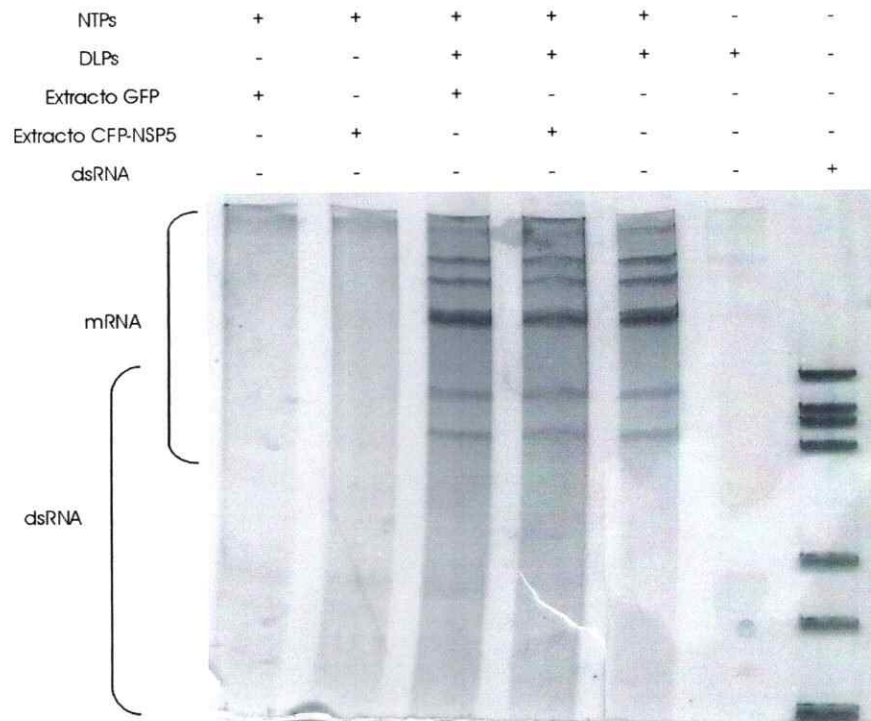


Figura 16. Efecto de CFP-NSP5 sobre la actividad transcripcional de la DLP. Células MA104 fueron transducidas con el correspondiente vector lentiviral, se lisaron y alícuotas de los extractos se incubaron toda la noche con DLPs. Posteriormente se realizó un ensayo de transcripción *in vitro*. La presencia de CFP-NSP5 en los extractos fue corroborada por Western Blot. El resultado de la transcripción fue resuelto en un gel de acrilamida 5% en condiciones desnaturalantes y teñido con plata.

formación de estas estructuras en presencia del inhibidor de la traducción CHX. De esta manera se inhibe la síntesis de proteínas virales que puedan inducir la formación de agregados de CFP-NSP5 (se ha observado que al co-expresar NSP5 con NSP2 se induce la formación de agregados).

En el ensayo se infectaron células CFP-NSP5⁺ en presencia de CHX. Como control de infección y del tratamiento con CHX se analizó la expresión de la proteína viral VP2 por inmunofluorescencia. No se observó la formación de agregados CFP-NSP5 ni la expresión de VP2 en las células tratadas con CHX, no así en los controles sin tratamiento con CHX (Fig. 17). Estos resultados demuestran la necesidad de la expresión de proteínas ya sean virales o celulares para la formación de agregados de CFP-NSP5.

A fin de corroborar estos resultados, se realizó un ensayo semejante con Rotavirus inactivados con luz UV (datos no mostrados), observándose los mismos resultados.

Los resultados obtenidos con CHX permiten concluir que es necesaria la expresión de proteínas para la formación de agregados de CFP-NSP5 de tipo VLS. Considerando que se obtuvieron los mismos resultados con virus inactivados, es probable que se requiera la expresión de por lo menos una mínima cantidad de proteínas virales para la formación de agregados de CFP-NSP5.

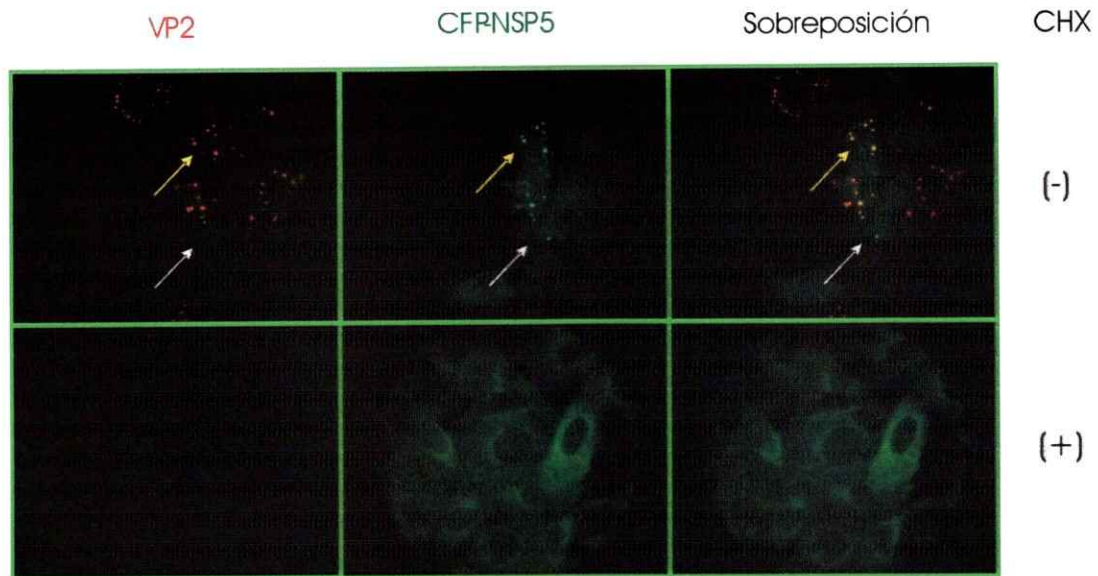


Figura 17. La DLP no induce la formación de agregados de CFP-NSP5 en presencia de CHX. Células MA104 fueron transducidas con CFP-NSP5 y tratadas con CHX 30 minutos previos a la infección, durante la adsorción y la infección. Se infectó a una MOI3. A las 2 y 6 h. p. i., fueron fijadas con PFA y analizadas por IFI VP2. Con flechas blancas se señalan los agregados de CFP-NSP5 y con flechas amarillas los viroplasmatas.

3.11. NSP5 es fosforilada en múltiples sitios durante la infección.

Muchos trabajos se han realizado sobre las fosforilaciones de NSP5, llegándose a proponer modelos y sitios responsables de la hiperfosforilación. Sin embargo no se ha identificado, ningún sitio fosforilado en NSP5 en el contexto de la infección viral.

A fin de determinar los sitios fosforilados en NSP5 se analizaron por MS las diferentes isoformas producidas durante la infección. Para ello se infectaron células MA104 y se purificó NSP5 por inmunoprecipitación, se resolvieron las diferentes isoformas en geles de acrilamida al 10% y se procedió a cortar los segmentos de geles correspondientes a las isoformas de 26kDa, 28kDa y 35 kDa. Las muestras fueron digeridas con diferentes proteasas y analizadas por ESI (electron spray ionization) acoplado QTOF (Quadrupole Time of Fly) lo que permitió realizar un análisis de masas en tandem (MS/MS).

En la Figura 18 se observa las diferentes porciones de la proteína obtenidas en los cortes con diferentes proteasas, no se identifican los péptidos que fueron obtenidos en forma repetida con diferentes enzimas. Con esta estrategia se logró cubrir aproximadamente el 95% de la secuencia proteica dejando, solo un sitio posible de ser fosforilado sin analizar (serina 143).

En el análisis secuencial realizado con diferentes proteasas se lograron identificar nueve sitios fosforilados distribuidos a lo largo de toda la proteína (Tabla 3). Entre ellos algunos propuestos anteriormente, como la serina 67 y la serina 164. Inesperadamente no se encontraron sitios fosforilados exclusivos para las isoformas de

1 MSLSIDVTSL PSIPSTIYKN ESSTTSTLS GKSIGRSEQY
41 ISPDAAEFNK YMLSKSPEDI GPSDSASNDP LTSFSIRSNA
81 VKTNADAGVS MDSSAQRSRS SNVGCQVDF SLNKGLKVKA
121 NLDSSISIST DTKKEKSKQN HKSRKHYPRI EAESDSDDYV
161 LDDSDSDDGK CKNCKYKKY FALRM~~RM~~KQV AMQLIEDL

Figura 18. Fragmentos de la proteína NSP5 cubiertos en el análisis de MS. Fragmentos obtenidos: Rojo: con tripsina; Azul: quimiotripsina; Púrpura: con tripsina y quimiotripsina; Verde: con Glu-C; Negro: fragmentos no cubiertos.

Tabla 3. Sitios de fosforilación de NSP5^a.

| Posición | Isoforma | | | Enzima ^b | % de Fosforilación ^c | |
|----------|----------|----|----|---------------------|---------------------------------|------|
| | 26 | 28 | 35 | | 26 | 28 |
| 2 or 4 | + | + | + | G,T,Q | nc | nc |
| 30 | + | + | - | T | 1,9 | 2,6 |
| 37 | + | + | - | T,Q | nc | nc |
| 42 | + | + | + | T | 8,4 | 20 |
| 56 | + | + | + | T | nc | nc |
| 67 | + | + | + | T | 4,7 | 6,1 |
| 101 | + | + | + | T,Q | 61,5 | 80 |
| 127 | + | + | + | T | 0,7 | 4,0 |
| 164 | + | + | + | Q,T/Q | 73,3 | 83,3 |

^a cepa SA11 (genbank Acc. N°. AAK15267).

^b Péptidos encontrados en la digestión con: G=Glu-C, T=Tripsina, Q=Quimiotripsina, T/Q=Tripsina y Quimiotripsina.

^cel porcentaje de fosforilación se calculó utilizando la siguiente fórmula: [intensidad de sitio fosforilado / (intensidad de sitio fosforilado+ intensidad de sitio no fosforilado)]* 100.

mayor tamaño; en la discusión se analizan los posibles mecanismos que llevan a la formación de las diferentes isoformas de NSP5.

Para ejemplificar cómo se realiza la identificación de los sitios de fosforilación, se describirá el análisis realizado para identificar la fosforilación de la serina 42. En la Figura 19a se observa la interpretación del programa MASSLINUX del espectro (fragmentos obtenidos por MS/MS) correspondiente al péptido comprendido por los aminoácidos 37 al 50 de NSP5. Se observan las proyecciones teóricas de los fragmentos esperados para ese péptido, en negro se puede observar cuando un péptido teórico fue encontrado en el espectro, en rojo cuando no. Los iones "y" (fragmentos correspondientes al análisis de derecha a izquierda de la molécula, lo cual implica de carboxilo terminal en dirección hacia el amino terminal) se encuentran sin modificaciones (fila superior) hasta la posición y8 (prolina 43). Luego se observa la aparición de los fragmentos con una pérdida de masa de 18 (pérdida de agua) (fila intermedia), la presencia de estos fragmentos es una indicación clara de la fosforilación en esa posición, ya que el enlace éster fosfato presente entre el carbono de la serina y el grupo fosforilo es muy lábil y se rompe fácilmente durante la fragmentación por ionización posterior al primer MS.

En la Figura 19b se muestra la interpretación del programa MASSLINUX considerando a la serina 42 fosforilada (nótese en la posición 6, Pse = serina fosforilada), se puede observar la aparición de los iones y9 al y11 con el péptido fosforilado. En la Figura 19c se observa la región del espectro correspondiente a los iones de interés, la presencia de los picos correspondientes a los iones y9-98 al y11-98

A.

| | | | | | | | | | | | | | | |
|------|---------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|
| b | 88.0399 | 217.0824 | 345.1410 | 508.2043 | 621.2884 | 708.3204 | 805.3732 | 920.4001 | 991.4373 | 1120.4799 | 1191.5170 | 1338.5853 | 1452.6283 | - |
| b-18 | 70.0293 | 199.0719 | 327.1305 | 490.1938 | 603.2778 | 690.3099 | 787.3627 | 902.3896 | 973.4267 | 1102.4692 | 1173.5063 | 1320.5747 | 1434.6177 | - |
| b-17 | 71.0133 | 200.0559 | 328.1145 | 491.1778 | 604.2618 | 691.2939 | 788.3467 | 903.3736 | 974.4107 | 1103.4534 | 1174.4905 | 1321.5588 | 1435.6018 | - |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |
| | Ser | Glu | Gln | Tyr | Ile | Ser | Pro | Asp | Ala | Glu | Ala | Phe | Asn | Lys |
| | 14 | 13 | 12 | 11 | 10 | 9 | 8 | 7 | 6 | 5 | 4 | 3 | 2 | 1 |
| y | - | 1511.7018 | 1382.6592 | 1254.6006 | 1091.5372 | 978.4532 | 891.4212 | 794.3684 | 679.3415 | 608.3044 | 479.2618 | 408.2247 | 261.1563 | 147.1134 |
| y-18 | - | 1493.6912 | 1364.6486 | 1236.5900 | 1073.5266 | 960.4427 | 873.4106 | 776.3578 | 661.3309 | 590.2938 | 461.2513 | 390.2141 | 243.1457 | 129.1028 |
| y-17 | - | 1494.6753 | 1365.6327 | 1237.5741 | 1074.5107 | 961.4267 | 874.3947 | 777.3419 | 662.3149 | 591.2778 | 462.2353 | 391.1982 | 244.1297 | 130.0868 |

B.

| | | | | | | | | | | | | | | |
|------|---------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|
| b | 88.0399 | 217.0824 | 345.1410 | 508.2043 | 621.2884 | 788.2868 | 885.3396 | 1000.3665 | 1071.4037 | 1200.4463 | 1271.4834 | 1418.5518 | 1532.5947 | - |
| b-18 | 70.0293 | 199.0719 | 327.1305 | 490.1938 | 603.2778 | 770.2762 | 867.3290 | 982.3560 | 1053.3931 | 1182.4357 | 1253.4728 | 1400.5411 | 1514.5841 | - |
| b-17 | 71.0133 | 200.0559 | 328.1145 | 491.1778 | 604.2618 | 771.2603 | 868.3130 | 983.3400 | 1054.3772 | 1183.4198 | 1254.4569 | 1401.5253 | 1515.5682 | - |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |
| | Ser | Glu | Gln | Tyr | Ile | Pse | Pro | Asp | Ala | Glu | Ala | Phe | Asn | Lys |
| | 14 | 13 | 12 | 11 | 10 | 9 | 8 | 7 | 6 | 5 | 4 | 3 | 2 | 1 |
| y | - | 1591.6682 | 1462.6254 | 1334.5670 | 1171.5037 | 1058.4196 | 891.4212 | 794.3684 | 679.3415 | 608.3044 | 479.2618 | 408.2247 | 261.1563 | 147.1134 |
| y-18 | - | 1573.6576 | 1444.6150 | 1316.5564 | 1153.4930 | 1040.4089 | 873.4106 | 776.3578 | 661.3309 | 590.2938 | 461.2513 | 390.2141 | 243.1457 | 129.1028 |
| y-17 | - | 1574.6417 | 1445.5991 | 1317.5405 | 1154.4772 | 1041.3931 | 874.3947 | 777.3419 | 662.3149 | 591.2778 | 462.2353 | 391.1982 | 244.1297 | 130.0868 |

C.

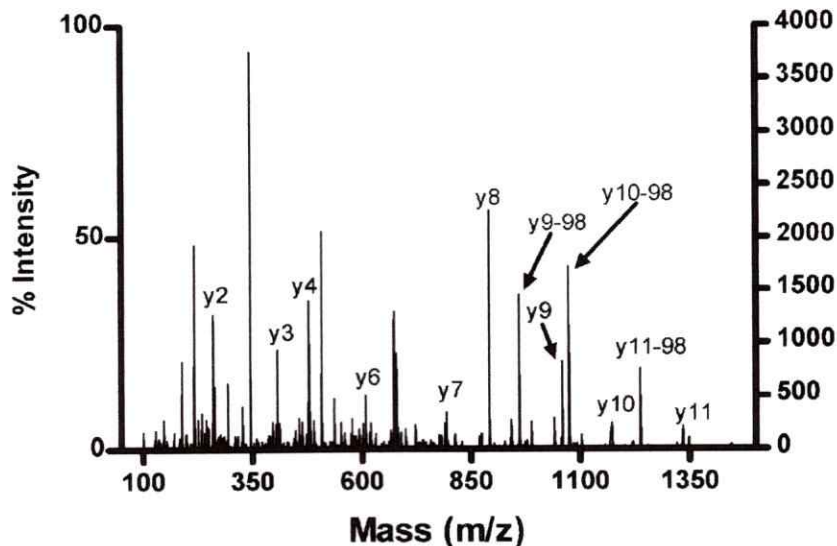


Figura 19. Fosforilación de la serina 42. (A) Interpretación con el MASSLINX del espectro del péptido m/z 839,42 proveniente de la digestión con tripsina correspondiente a la región 37 a 50 de NSP5 (**SEQYISPDAEAFNK**). (B) Interpretación del espectro considerando la serina 42 como fosforilada (Pse = serina fosforilada). (C) Espectro del péptido mencionado. La presencia de los iones y9-98 al y11-98 además de los iones y9 al y11 fosforilados son una clara señal que la serina 42 se encuentra fosforilada. Pse: serina fosforilada. Nótese que los iones y9-18 al y11-18 de la sección A corresponden a los iones y9-98 al y11-98 de la sección C.

(18 del agua más 80 del grupo fosfato) que presentan una intensidad mayor que sus contrapartes y9 al y11, es una clara indicación de la fosforilación de la serina 42.

La interpretación de los datos de MS requiere un conocimiento acabado de las modificaciones presentes en la proteína, a fin de identificar la secuencia de una masa determinada. En nuestro análisis se incluyeron un gran número de modificaciones post-traduccionales teóricas en NSP5 tales como: acetilaciones, metilaciones, diferentes tipos de fosforilaciones y varios tipos de O-glicosilaciones con el fin de aumentar la cobertura de la proteína. Se ha reportado, en la cepa viral OSU, que NSP5 se encuentra O-glicosilada con un residuo de N-Acetil glucosamina (NAG) (Gonzalez y Burrone, 1991), en nuestro análisis, pese a haber incluido la posible presencia de un residuo de NAG, ningún péptido con esta modificación fue encontrado.

3.12. Las isoformas de 26 y 28 kDa presentan diferentes niveles de fosforilación.

Tal como fue mencionado en la introducción existen antecedentes claros que los cambios en la migración de NSP5 son debido a fosforilaciones, sin embargo en el análisis detallado en la sección 3.11 no se observaron sitios diferenciales que permitan explicar los cambios de migración de NSP5. A fin de clarificar este problema se procedió a calcular el porcentaje de fosforilación para algunos residuos.

Para ello se calculó la intensidad del pico del ion extraído en el cromatograma de los péptidos fosforilados y sus contrapartes no fosforiladas. El análisis del grado de fosforilación se realizó sólo con las isoformas de 26 kDa y 28 kDa ya que la co-precipitación de la proteína NSP2, la cual co-migra con la isoforma de 35 kDa, dificultó el análisis de esta isoforma.

Se observó un bajo nivel de fosforilación para las diferentes serinas excepto para las posiciones 101 y 164, las cuales poseen un alto grado de fosforilación. Sin embargo, para todos los sitios se observó un porcentaje mayor en la isoforma de 28 kDa en comparación con la de 26 kDa (Tabla 3).

Estudios anteriores han demostrado un estado dinámico en la fosforilación de NSP5, el que se ha sugerido ocurre debido a la acción de quinasas y fosfatasas (Blackhall et al., 1998). Por ello decidimos caracterizar el comportamiento de las diferentes posiciones fosforiladas identificadas realizando un análisis cinético del grado de fosforilación. Pese a observarse diferentes comportamientos en los sitios analizados, el comportamiento general fue un aumento en el nivel de fosforilación en la isoforma 28 kDa en comparación con la de 26 kDa. (Fig. 20).

Ambos resultados llevan a la conclusión que los cambios en la migración de NSP5 se deben a un aumento en el número de fosforilaciones en diferentes posiciones de cada molécula más que a la fosforilación específica en una posición.

3.13. NSP5 es acetilada en su extremo amino terminal.

Como se mencionó anteriormente la interpretación de los datos de MS requiere un conocimiento acabado de la molécula, de esta forma fue que al ensayar modificaciones teóricas de NSP5 se logró identificar la acetilación en el amino terminal de la serina 2. Normalmente esta modificación ocurre posterior a la eliminación de la metionina 1.

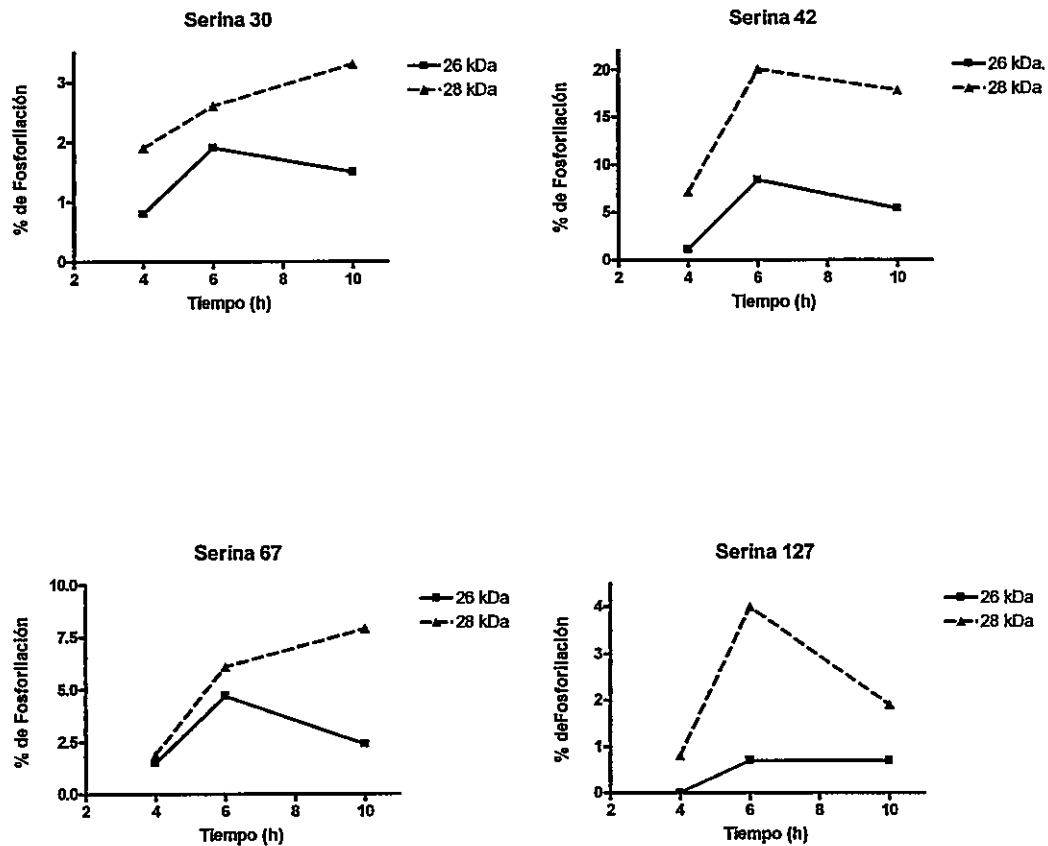


Figura 20. Cinética de los sitios de fosforilación. NSP5 fue purificada por inmunoprecipitación en los tiempos establecidos, resuelta en gel acrilamida 12% y cortada con tripsina. Posteriormente los péptidos fueron analizados por ESI MS. Utilizando el programa MASSLINXS se cuantificó la intensidad de los picos en el cromatograma por el método de "Extracted Ions". El porcentaje de fosforilación fue calculado tal como fue descrito en la Tabla 3.

En la Figura 21a se observa la interpretación del espectro del péptido correspondiente a la región 2 al 21. El análisis se realizó en base a los iones b, que corresponden a los fragmentos en dirección del amino hacia carboxilo. La presencia del pico b2 con un aumento de masa de 43 Da corresponde a la serina acetilada. Además, los picos correspondientes a los iones b2 al b5 con pérdida de agua (fila intermedia) suponen una fosforilación. En la Figura 21b se observa la interpretación del espectro considerando a la serina 2 fosforilada, se observa la presencia de los iones b3 al b6 fosforilados.

En la Figura 21c se observa la región del espectro correspondiente a los iones de interés. Es de notar que los iones b3-55 al b5-55 (98 Da de la fosforilación - 43 Da de la acetilación) presentan una gran intensidad dando una clara señal que los péptidos se encuentran fosforilados. Sin embargo, al no observarse una diferencia significativa entre las señales b2 y b2-55 no se puede distinguir el sitio de fosforilación entre la serina 2 y la serina 4.

3.14. NSP5 presenta un puente disulfuro intramolecular en un contexto característico de oxidoreductasas.

Otra modificación post-traducciona l identificada fue la presencia de un puente disulfuro intracadena entre la cisteína 171 y la cisteína 174. Este fue identificado gracias a que durante la purificación de NSP5, se utilizó un tampón de carga sin agentes reductores, manteniendo intacto los puentes disulfuro.

A.

| | | | | | | | | | | |
|------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| b | 130.0426 | 243.1267 | 330.1587 | 443.2428 | 558.2697 | 657.3381 | 758.3858 | 845.4178 | 958.5019 | 1055.5547 |
| b-18 | 112.0320 | 225.1161 | 312.1481 | 425.2322 | 540.2592 | 639.3276 | 740.3752 | 827.4073 | 940.4913 | 1037.5441 |
| b-17 | 113.0161 | 226.1001 | 313.1321 | 426.2162 | 541.2432 | 640.3116 | 741.3593 | 828.3913 | 941.4753 | 1038.5282 |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| | AcS | Leu | Ser | Ile | Asp | Val | Thr | Ser | Leu | Pro |
| | 18 | 17 | 16 | 15 | 14 | 13 | 12 | 11 | 10 | 9 |
| y | - | 1834.0186 | 1720.9346 | 1633.9025 | 1520.8185 | 1405.7915 | 1306.7230 | 1205.6754 | 1118.6434 | 1005.5593 |
| y-18 | - | 1816.0079 | 1702.9240 | 1615.8918 | 1502.8079 | 1387.7809 | 1288.7124 | 1187.6648 | 1100.6328 | 987.5488 |
| y-17 | - | 1816.9921 | 1703.9081 | 1616.8760 | 1503.7920 | 1388.7650 | 1289.6965 | 1188.6489 | 1101.6169 | 988.5328 |

B.

| | | | | | | | | | | |
|------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| b | 210.0089 | 323.0930 | 410.1250 | 523.2090 | 638.2360 | 737.3044 | 838.3521 | 925.3841 | 1038.4681 | 1135.5210 |
| b-18 | 191.9983 | 305.0824 | 392.1144 | 505.1985 | 620.2255 | 719.2939 | 820.3416 | 907.3735 | 1020.4576 | 1117.5104 |
| b-17 | 192.9823 | 306.0664 | 393.0984 | 506.1825 | 621.2095 | 720.2779 | 821.3256 | 908.3575 | 1021.4416 | 1118.4945 |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| | ASP | Leu | Ser | Ile | Asp | Val | Thr | Ser | Leu | Pro |
| | 18 | 17 | 16 | 15 | 14 | 13 | 12 | 11 | 10 | 9 |
| y | - | 1834.0186 | 1720.9346 | 1633.9025 | 1520.8185 | 1405.7915 | 1306.7230 | 1205.6754 | 1118.6434 | 1005.5593 |
| y-18 | - | 1816.0079 | 1702.9240 | 1615.8918 | 1502.8079 | 1387.7809 | 1288.7124 | 1187.6648 | 1100.6328 | 987.5488 |
| y-17 | - | 1816.9921 | 1703.9081 | 1616.8760 | 1503.7920 | 1388.7650 | 1289.6965 | 1188.6489 | 1101.6169 | 988.5328 |

C.

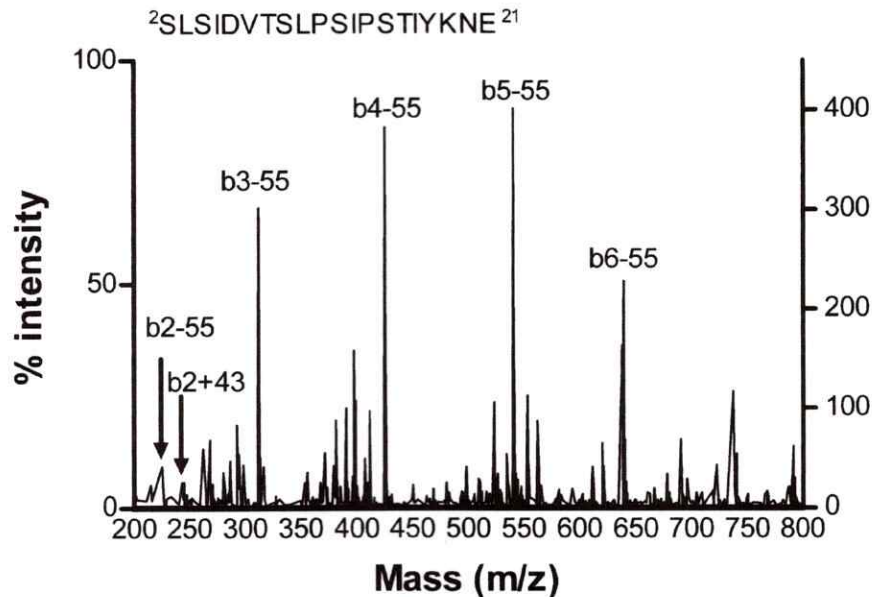


Figura 21. Acetilación y posible fosforilación de la serina 2. (A) Interpretación del espectro del péptido m/z 1143,54 proveniente de la digestión con Glu-C, correspondiente a la región 2 a 21 de NSP5 (SLSIDVTSLSIPSTIYKNE), considerando a la serina 2 acetilada (aumento de masa de 43 Da). (B) Interpretación del espectro considerando a la serina 2 acetilada y fosforilada. (C) Región del espectro donde se observan los picos correspondientes a los iones b2 al b6, la acetilación implica un aumento de 43 Da, los péptidos fosforilados presentan una pérdida de 55 Da (98-43), los péptidos correspondientes a b3-55 al b5-55 presentan una alta intensidad, dando una clara señal que se encuentran fosforilados. AcS: serina acetilada, ASP: serina acetilada y fosforilada. Nótese que los iones b2-18 al b6-18 de la sección A corresponden a los iones b2-55 al b6-55 de la sección C.

En la Figura 22a se observa la interpretación del espectro sin modificaciones donde no se identificaron iones y. En la Figura 22b se observa el análisis al agregar la modificación teórica del puente disulfuro en la interpretación, la normalización de los iones y8 al y12 son una clara señal de la presencia del puente disulfuro. Además, la aparición de las señales y13 al y15 con pérdida de una molécula de agua, sugieren la de fosforilación de la serina 164. En la Figura 22c se observa la interpretación considerando a la serina 164 fosforilada, la presencia de los iones y13 al y15 fosforilados confirman la fosforilación en la serina 164. En la Figura 22d se grafica el espectro analizado donde se identifican los péptidos de interés.

Además se realizó el análisis de la proteína luego de la reducción y alquilación del puente disulfuro, observándose las señales de las cisteínas modificadas (datos no mostrados). Es de notar que no se encontró el péptido sin el puente disulfuro lo cual, nos permite proponer la mayoría de las moléculas se encuentran formando esta estructura.

Este puente disulfuro se encuentra dentro del motivo CXXC, el cual es característico del sitio activo de la superfamilia de las tiol-disulfuro oxidoreductasas (Rietsch y Beckwith, 1998), específicamente de un dominio con un plegamiento de tipo tioredoxina.

Al hacer un alineamiento entre diferentes proteínas con este dominio (PFAM N° PF00085) y NSP5 se observó una similitud menor al 10% (datos no mostrados), por lo que no fue posible realizar una predicción estructural utilizando este motivo como matriz.

A.

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|-----|
| b | 328.1873 | 443.2142 | 530.2462 | 645.2731 | 732.3052 | 847.3322 | 962.3591 | 1019.3806 | 1147.4755 | 1250.4847 | 1378.5797 | 1492.6226 | 1595.6317 | 1723.7267 | - | |
| b-18 | 310.1767 | 425.2036 | 512.2357 | 627.2626 | 714.2946 | 829.3216 | 944.3485 | 1001.3700 | 1129.4648 | 1232.4741 | 1360.5691 | 1474.6119 | 1577.6211 | 1705.7161 | - | |
| b-17 | 311.1607 | 426.1877 | 513.2197 | 628.2466 | 715.2786 | 830.3056 | 945.3325 | 1002.3540 | 1130.4490 | 1233.4583 | 1361.5532 | 1475.5961 | 1578.6052 | 1706.7002 | - | |
| | | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 |
| | | Asp | Asp | Ser | Asp | Ser | Asp | Asp | Gly | Lys | Cys | Lys | Asn | Cys | Lys | Tyr |
| y | 1692.6481 | 1577.6212 | 1462.5942 | 1375.5623 | 1280.5353 | 1173.5032 | 1058.4763 | 943.4493 | 866.4279 | 758.3329 | 655.3237 | 527.2288 | 413.1859 | 310.1767 | 182.0817 | |
| y-18 | 1674.6375 | 1559.6106 | 1444.5836 | 1357.5516 | 1242.5247 | 1155.4926 | 1040.4657 | 925.4388 | 868.4173 | 740.3224 | 637.3132 | 509.2182 | 395.1753 | 292.1661 | 164.0712 | |
| y-17 | 1675.6216 | 1560.5947 | 1445.5677 | 1358.5358 | 1243.5088 | 1156.4767 | 1041.4498 | 926.4228 | 869.4013 | 741.3064 | 638.2972 | 510.2022 | 396.1593 | 293.1501 | 165.0552 | |

B.

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|-----|
| b | 328.1873 | 443.2142 | 530.2462 | 645.2731 | 732.3052 | 847.3322 | 962.3591 | 1019.3806 | 1147.4755 | 1248.4769 | 1377.5719 | 1491.6147 | 1593.6162 | 1721.7112 | - | |
| b-18 | 310.1767 | 425.2036 | 512.2357 | 627.2626 | 714.2946 | 829.3216 | 944.3485 | 1001.3700 | 1129.4648 | 1231.4663 | 1359.5613 | 1473.6041 | 1575.6056 | 1703.7006 | - | |
| b-17 | 311.1607 | 426.1877 | 513.2197 | 628.2466 | 715.2786 | 830.3056 | 945.3325 | 1002.3540 | 1130.4490 | 1232.4504 | 1360.5454 | 1474.5883 | 1576.5897 | 1704.6847 | - | |
| | | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 |
| | | Asp | Asp | Ser | Asp | Ser | Asp | Asp | Gly | Lys | S-S | Lys | Asn | S-S | Lys | Tyr |
| y | 1690.6326 | 1575.6056 | 1480.5786 | 1373.5466 | 1258.5197 | 1171.4877 | 1056.4607 | 941.4338 | 884.4123 | 756.3173 | 654.3159 | 526.2210 | 412.1781 | 310.1767 | 182.0817 | |
| y-18 | 1672.6219 | 1557.5950 | 1442.5680 | 1355.5360 | 1240.5090 | 1153.4771 | 1038.4501 | 923.4232 | 866.4017 | 738.3068 | 636.3054 | 508.2105 | 394.1675 | 292.1661 | 164.0712 | |
| y-17 | 1673.6061 | 1558.5791 | 1443.5521 | 1356.5201 | 1241.4932 | 1154.4612 | 1039.4342 | 924.4072 | 867.3857 | 739.2908 | 637.2894 | 509.1945 | 395.1516 | 293.1501 | 165.0552 | |

C.

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|-----|
| b | 328.1873 | 443.2142 | 530.2462 | 645.2731 | 812.2715 | 927.2885 | 1042.3254 | 1099.3469 | 1227.4419 | 1329.4432 | 1457.5382 | 1571.5812 | 1673.5825 | 1801.6775 | - | |
| b-18 | 310.1767 | 425.2036 | 512.2357 | 627.2626 | 794.2610 | 909.2880 | 1024.3148 | 1081.3363 | 1209.4313 | 1311.4326 | 1439.5276 | 1553.5706 | 1655.5719 | 1783.6669 | - | |
| b-17 | 311.1607 | 426.1877 | 513.2197 | 628.2466 | 795.2450 | 910.2720 | 1025.2990 | 1082.3204 | 1210.4154 | 1312.4167 | 1440.5117 | 1554.5547 | 1656.5560 | 1784.6510 | - | |
| | | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 |
| | | Asp | Asp | Ser | Asp | Pse | Asp | Asp | Gly | Lys | S-S | Lys | Asn | S-S | Lys | Tyr |
| y | 1770.5989 | 1655.5720 | 1540.5450 | 1453.5131 | 1338.4861 | 1171.4877 | 1056.4607 | 941.4338 | 884.4123 | 756.3173 | 654.3159 | 526.2210 | 412.1781 | 310.1767 | 182.0817 | |
| y-18 | 1752.5893 | 1637.5614 | 1522.5344 | 1435.5024 | 1320.4755 | 1153.4771 | 1038.4501 | 923.4232 | 866.4017 | 738.3068 | 636.3054 | 508.2105 | 394.1675 | 292.1661 | 164.0712 | |
| y-17 | 1753.5724 | 1638.5455 | 1523.5186 | 1436.4866 | 1321.4596 | 1154.4612 | 1039.4342 | 924.4072 | 867.3857 | 739.2908 | 637.2894 | 509.1945 | 395.1516 | 293.1501 | 165.0552 | |

D.

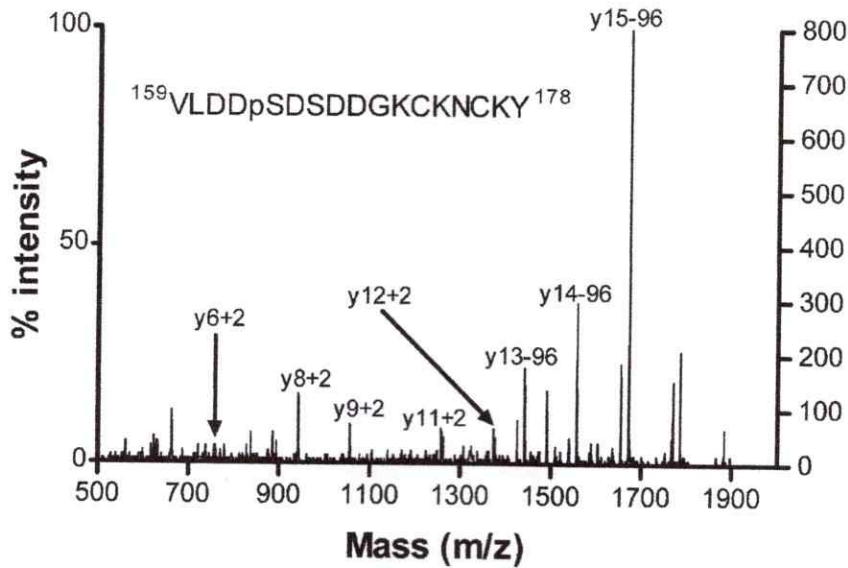


Figura 22. Análisis del puente disulfuro intramolecular. (A) Interpretación con el programa MASSLINX del espectro del péptido m/z 661,58 proveniente de la digestión quimiotrítica correspondiente a la región 159 a 178 de NSP5 (VLDDSDSDDGKCKNCKY). (B) Interpretación del espectro considerando el puente disulfuro entre las cisteínas 171 y 174, se observa una normalización de los iones y_8 al y_{12} y la aparición de las señales y_{13-18} al y_{16-18} lo cual indica la fosforilación de la serina 164. (C) Interpretación del espectro considerando la serina 164 fosforilada, se observa la aparición de las señales y_{13} al y_{14} . (D) Región del espectro donde se observan los iones de mayor interés. Los iones y_6 al y_{12} presentan un aumento de masa de 2 Da (correspondientes al puente disulfuro) y los iones y_{13} al y_{15} una pérdida de masa de 96 Da (98-2) correspondientes a los péptidos fosforilados. Pse: serina fosforilada, S-S: cisteína involucrada en puente disulfuro. Nótese que los iones y_6 al y_{12} de la sección B corresponden a los iones y_{6+2} al y_{12+2} de la sección D y los iones y_{13} al y_{15} de la sección B corresponden a los iones y_{13-96} al y_{15-96} de la sección D

3.15. Conservación de las modificaciones identificadas entre cepas de Rotavirus.

Los virus son excelentes modelos para estudios evolutivos debido a su alta variabilidad, por lo que la conservación de residuos pueden relacionarse con una posible función en la molécula (Strauss EG, 2001). Por ello se decidió comparar secuencias de diferentes grupos de Rotavirus y determinar el grado de conservación de los residuos que presentan las modificaciones identificadas.

Se realizó un alineamiento comparando las secuencias de NSP5 de los grupos A y C de Rotavirus, estos poseen una similitud de alrededor de un 20%. Como se puede observar en la Figura 23 varios residuos con modificaciones se encuentran conservados, tales como la serina en posición 2, la serina 30 y particularmente la serina 67, donde además se encuentra conservado el contexto alrededor de la misma. También se encuentran conservadas las cisteínas involucradas en el puente disulfuro y los aminoácidos presentes entre ellas; esto resulta interesante ya que se ha observado que estos aminoácidos son importante en la formación de los puentes disulfuro en los motivos CXXC (Chivers et al., 1996; Chivers et al., 1997).

El motivo CXXC se encuentra siempre precediendo una estructura de alfa hélice. Al realizar un análisis de estructura secundaria para ambos grupos se observó la presencia de una estructura alfa hélice dos aminoácidos hacia el C-terminal del puente disulfuro.

Además, se puede observar como la serina 164, se encuentra sustituida por un residuo de ácido glutámico en el grupo C, esta es una modificación conservativa si consideramos que la serina presentaba un alto porcentaje de fosforilación (Fig. 21).

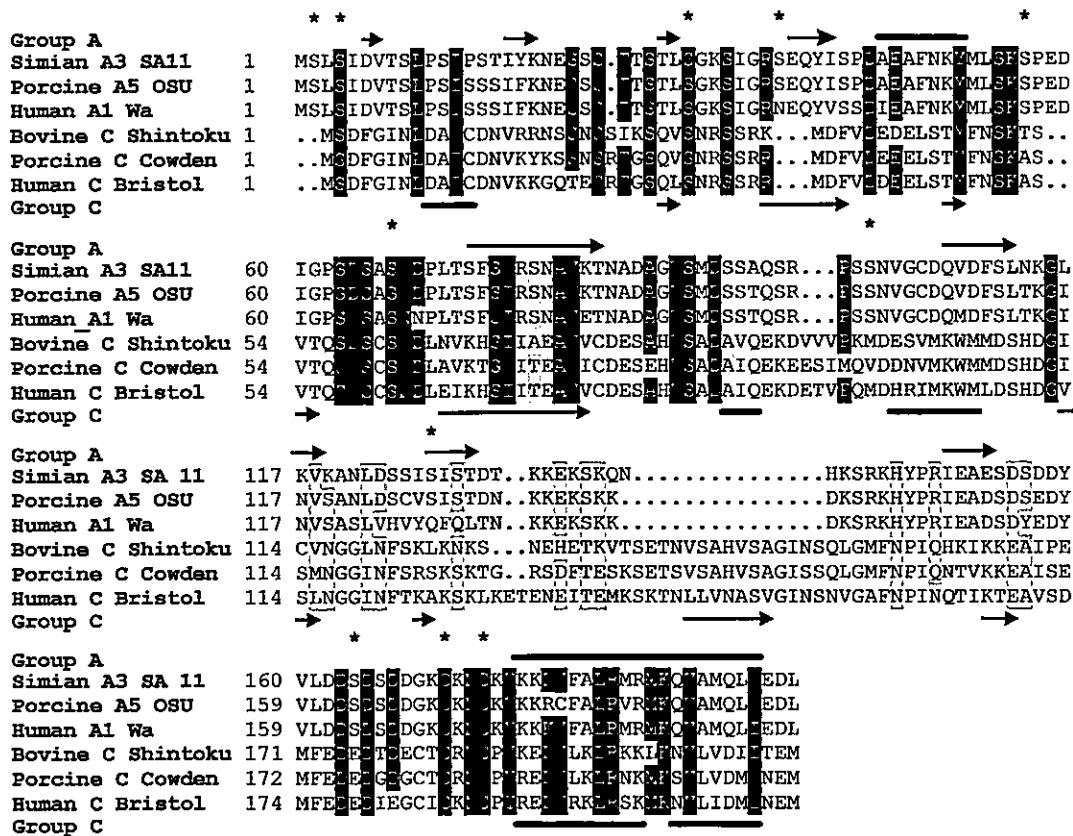


Figura 23. Alineamiento entre diferentes cepas de Rotavirus. Alineamiento múltiple, realizado con el programa Clustal X entre de cepas del grupo A y C de Rotavirus. Los residuos idénticos y similares se observan en negro y gris respectivamente. Los asteriscos indican las modificaciones encontradas en el análisis por MS. Las secuencias corresponden según genbank Simian A3 SA11 (AAK15267), Porcine A5 OSU (P19715), Human A1 Wa (V01191), Bovine C Shintoku (P34718), Porcine C Cowden (P36358) y Human C Bristol (Q00682). La estructura secundaria fue determinada con el predictor JPRED (Cuff et al., 1998) usando como matriz SA11 para grupo A y Bristol para grupo C. Las flechas significan lámina beta, las líneas significan alfa hélices.

3.16. Análisis de proteínas que interactúan con NSP5 por medio de MS.

Poco se conoce sobre el rol de proteínas celulares en la replicación del Rotavirus, por ello decidimos identificar por MS las proteínas que interactúan con NSP5 en el contexto de la infección viral.

Para ello realizamos un ensayo de co-precipitación y separación por PAGE, los carriles fueron cortados en pedazos para posteriormente ser digeridos con tripsina y los péptidos producidos fueron analizados por ESI QTOF MS/MS. A fin de determinar interacciones inespecíficas se utilizaron como controles extracto de células MA104 sin infectar incubadas con sepharosa proteína A unida a anticuerpo anti-NSP5 y de células MA104 infectadas incubadas con sepharosa proteína A sin anticuerpo.

Las proteínas identificadas se clasificaron según el número de péptidos encontrados en la co-precipitación y en los controles, en: proteínas con muy alta probabilidad de interacción con NSP5 y proteínas con alta probabilidad de interacción con NSP5 (Tabla 4).

Es de notar que en este análisis hubo una total concordancia con los resultados obtenidos para los componentes de las SVP (Gallegos y Patton, 1989), además de otras interacciones probadas para NSP5 tales como, NSP2 (Afrikanova et al., 1998) y VP1 (Arnoldi et al., 2007), estos antecedentes comprueban la funcionalidad del sistema.

Tabla 4. Proteínas que interactúan con NSP5

| Proteínas con muy alta probabilidad de interacción con NSP5 | | | |
|---|-------------------|---------------------|---------|
| Proteína | A.C. SwissProt | Péptidos en | |
| | | Co-ppt ^a | Control |
| Ras-related protein Rab-11A Rab-11 | P62490 | 5 | 0 |
| Ras-related protein Rab-1A | P62822 | 4 | 0 |
| 40S ribosomal protein S4, X isoform | Q76N24 | 18 | 3 |
| Src substrate cortactin | Q14247 | 10 | 0 |
| Neutral alpha-glucosidase AB precursor | Q14697 | 4 | 0 |
| Serpin B3 (Squamous cell carcinoma antigen 1) (SCCA-1) (Protein T4-A) | P29508 | 18 | 1 |
| NSP1 | P15687 | 4 | 0 |
| VP1 | P22678 | 28 | 0 |
| VP4 | P17463 | 11 | 0 |

| Proteínas con alta probabilidad de interacción con NSP5 | | | |
|---|-------------------|---------------------|---------|
| Proteína | A.C. SwissProt | Péptidos en | |
| | | Co-ppt ^a | Control |
| Vimentin | P84198 | 23 | 11 |
| 60S ribosomal protein L18 | Q5E973 | 3 | 0 |
| Proteasome subunit beta type 6 precursor | P28072 | 3 | 0 |
| Serpin B4 (Squamous cell carcinoma antigen 2) (SCCA-2) (Leupin) | P48594 | 2 | 0 |
| Cytosolic acyl coenzyme A thioester hydrolase | O00154 | 2 | 0 |
| 60S ribosomal protein L9 | P32969 | 2 | 0 |
| 60S ribosomal protein L29 | Q8HXB8 | 2 | 0 |
| Splicing factor, arginine/serine-rich 7 (Splicing factor 9G8) | Q16629 | 2 | 0 |
| Annexin A8 (Annexin VIII) | Q95L54 | 2 | 0 |
| NSP2 | P03536 | 10 | 6 |
| NSP3 | Q03242 | 30 | 13 |

^a Co-precipitación

DISCUSIÓN.

La genética reversa es una aproximación experimental que busca conocer la funcionalidad de un gen, en oposición a la genética clásica o directa que busca conocer las bases genéticas de un fenotipo. Este mecanismo de estudio consiste en la mutación específica de un gen para posteriormente observar los fenotipos producidos por esta mutación. El principal problema en el estudio del ciclo replicativo de Rotavirus es la falta de un sistema de genética reversa que permita el estudio funcional de proteínas no estructurales.

Recientemente ha sido diseñado un sistema de genética reversa para proteínas estructurales de Rotavirus, donde se observó una muy baja eficiencia en la obtención de virus recombinante, pudiéndose sólo aislar estos virus luego de numerosos pasajes en un estricto sistema de selección. Estos resultados han llevado a la conclusión de que la introducción de material genético foráneo dentro de la partícula viral es un hecho extremadamente complejo (Komoto et al., 2006). Esto se considera como el principal problema en el desarrollo de un sistema de genética reversa.

A fin de proponer una alternativa, en nuestro laboratorio diseñamos un sistema de trans-complementación basado en la expresión en *trans* de la proteína viral NSP5 y el silenciamiento de la expresión por medio de siRNA de la proteína codificada por la partícula viral.

NSP5 es una proteína viral esencial para la replicación (Vascotto et al., 2004), la cual es capaz de multimerizar y está sujeta a diferentes eventos de fosforilación durante la infección (Blackhall et al., 1998; Poncet et al., 1997). Se han propuesto diferentes

modelos sobre los eventos que llevan a la fosforilación de NSP5 (Eichwald et al., 2002), proponiendo a la serina 67 como actor fundamental en este proceso (Eichwald et al., 2004a). Además esta proteína es capaz de interactuar con otras proteínas virales tales como NSP2 (Afrikanova et al., 1998), VP2 (Berois et al., 2003) y VP1 (Arnoldi et al., 2007). Pese a lo mencionado anteriormente no se conoce la función específica de NSP5 en el ciclo viral. Recientemente se ha logrado silenciar la expresión de esta proteína por medio de siRNA (Campagna et al., 2005; Lopez et al., 2005). La posibilidad de inhibir su expresión además del conocimiento estructural (residuos que pueden relacionarse con funciones específicas) convertirían a NSP5, en un buen candidato para el sistema de trans-complementación.

Es de notar que recientemente se han reportado ensayos de trans-complementación, semejantes al propuesto en este trabajo, para la proteína viral NSP2. En ellos se infectó con una cepa termosensible para NSP2, además se trató con siRNA para inhibir la expresión de la NSP2 viral; luego se procedió a complementar en *trans* una variante de NSP2 resistente al siRNA (Taraporewala et al., 2006), esto demuestra la factibilidad del sistema.

Pese a haber obtenido resultados satisfactorios tanto en la expresión como en el silenciamiento de NSP5 (Fig. 5), al realizar los ensayos de trans-complementación pudimos observar que la expresión en *trans* de NSP5 previa a la infección posee un efecto inhibitorio sobre el ciclo viral (Fig. 6, Tabla 2).

El efecto negativo de trNSP5 sobre la infección nos planteó una disyuntiva: ¿cómo una proteína que es esencial para la replicación puede ser al mismo tiempo perjudicial para la infección? Conscientes de que este efecto inhibitorio planteaba un

serio desafío al sistema de trans-complementación, decidimos caracterizar este fenómeno analizando el efecto de la expresión en *trans* de NSP5 sobre las diferentes etapas del ciclo viral.

De esta forma pudimos observar que tanto la expresión de trNSP5 como la expresión de una variante CFP-NSP5 afectaban la síntesis de nuevas partículas y la formación de viroplasmias (Figs. 7, 8 y 10). Los ensayos de inmunofluorescencia nos brindaron información sobre el momento del ciclo viral en que trNSP5 podría estar inhibiendo la infección. Las células que expresaban trNSP5 eran capaces de inhibir no solo la formación de viroplasmias sino también la expresión de las proteínas virales. Este efecto podría deberse a una acción indirecta, ya que al inhibir la morfogénesis de nuevas DLPs también se inhibiría la segunda ola de transcripción. Sin embargo, esta explicación es poco probable, ya que en un experimento anterior al inhibir la replicación, por medio de siRNA contra NSP5, y por ende la segunda ola de transcripción, observamos una expresión basal de VP6 (Fig. 5b). Por lo tanto, este efecto se debería probablemente a la actividad transcripcional de la DLP-PP. Tal como se mencionó anteriormente, no se observó VP6 cuando trNSP5 inhibió la infección al ser expresada en *trans* (Fig. 8a).

Además, el efecto inhibitorio de trNSP5 sobre la síntesis proteica en momentos tempranos previos a la replicación es confirmado por los resultados obtenidos en la Figura 13, donde se observa una inhibición de la expresión proteica a las 3 h. p. i. (momento previo a la replicación) donde la mayoría de los mensajeros provienen de la partícula primigenia (Lopez et al., 2005). Por último, la necesidad de expresión proteica (probablemente de NSP2) para la formación de agregados de CFP-NSP5 (Fig.

17), refuerza la hipótesis de que la inhibición por trNSP5 ocurre en etapas tempranas. Si NSP5 efectuase su efecto inhibitorio post-expresión proteica sería factible de esperar, debido a la presencia de proteínas virales (NSP2), un mayor número de células con agregados de CFP-NSP5.

Al analizar el efecto de la cantidad de partículas sobre la inhibición por trNSP5 observamos que el aumento de MOI revirtió parcialmente no sólo la formación de viroplasma sino también la síntesis de dsRNA (Fig 11. y 12.). Esto nos lleva a dos conclusiones: la partícula primigenia (o los productos provenientes de ésta) está involucrada en el efecto inhibitorio de NSP5 y por otro lado, este fenómeno es reversible. El comportamiento relativamente lineal entre la MOI y la formación de viroplasma supone un efecto directo de trNSP5 sobre la partícula primigenia o sus productos (Fig. 11).

Existen antecedentes para otros miembros de la familia *Reoviridae* en donde las partículas primigenias son introducidas a los viroplasma; particularmente en Reovirus se ha observado que la proteína μ NS cumple esta función (Broering et al., 2004). Cabe destacar que esta proteína presenta varias características funcionales comunes con NSP5: I) interactuar con la homóloga de NSP2, σ NS, II) formar agregados tipo viroplasma (Becker et al., 2003; Touris-Otero et al., 2004). De igual manera NSP5 es capaz de interactuar con las proteínas estructurales componentes de la DLP, VP1 (Arnoldi et al., 2007) y VP2 (Berois et al., 2003).

Considerando estos antecedentes y el efecto inhibitorio temprano en la infección mediado por trNSP5, una hipótesis posible es que trNSP5 interactúe con la DLP

afectando su funcionalidad. De esta forma y teniendo en cuenta que en los estudios de trans-complementación trNSP5 se encuentra previa a la infección, esta podría interactuar con la DLP-PP luego de la pérdida de la cubierta externa. Ante este escenario decidimos analizar la posible interacción entre la DLP y NSP5. Los ensayos de co-precipitación de NSP5 con la DLP realizados tanto *in vivo* (Fig. 14) como *in vitro* (Fig.15) no mostraron una interacción entre DLP y trNSP5. Esto sugiere que trNSP5 no ejerce su acción inhibitoria en forma directa sobre la DLP. Además pudimos comprobar que trNSP5 no ejerce su efecto sobre la principal función de la DLP, su actividad transcripcional (Fig. 16).

Los resultados presentados anteriormente nos permiten acotar el efecto inhibitorio de trNSP5 a un momento específico del ciclo viral que se sitúa posterior a la síntesis de mensajeros por parte de la DLP-PP y previo a la formación de viroplasmata.

Tal escenario remite a dos eventos sobre los cuales trNSP5 puede ejercer su efecto inhibitorio: I) sobre la estabilidad o accesibilidad de los mRNAs virales. En torno a este tema se ha observado que NSP5 posee afinidad tanto por ssRNA así como dsRNA (Vende et al., 2002). Sin embargo, no se ha observado afinidad específica de NSP5 por RNA viral; dicho trabajo fue realizado con NSP5 expresada en bacterias por lo que la falta de modificaciones post-traduccionales podría afectar la especificidad por ssRNA. Por otro lado se ha propuesto que NSP5 y particularmente la fosforilación de la misma, desplazaría el destino de los mRNA hacia la replicación en detrimento de la traducción (Chnaiderman et al., 2002). La presencia de trNSP5 podría desplazar a los mRNAs virales hacia un destino replicativo, el cual no podría realizarse debido a la falta de otras proteínas virales, tales como NSP2. II) que ejerza su efecto inhibitorio a nivel de la

traducción proteica. No existen mayores antecedentes sobre la interacción de NSP5 con ribosomas o con factores traduccionales. En nuestro análisis por MS identificamos la co-precipitación de varias proteínas ribosomales con NSP5 (Tabla 4). El efecto de NSP5 sobre la traducción tanto de proteínas virales o celulares es un tema interesante de ser estudiado en el futuro.

El análisis de proteínas que co-precipitan con NSP5 por MS dio resultados interesantes y prometedores. Cabe señalar la semejanza de los resultados obtenidos en nuestro estudio con los SVP observados previamente (Gallegos y Patton, 1989), confirmando la posible participación de estas proteínas en la replicación. Además la identificación de proteínas con interacciones probadas para NSP5 tales como NSP2 (Afrikanova et al., 1998) y VP1 (Arnoldi et al., 2007) permiten la validación del ensayo. No se observó una interacción entre NSP5 y VP2 como se ha reportado anteriormente (Berois et al., 2003), sin embargo nuestros resultados concuerdan con lo reportado recientemente por Arnoldi y colaboradores (Arnoldi et al., 2007), donde no fue posible observar una co-precipitación de VP2 con NSP5.

Entre las proteínas identificadas por MS no reportadas, resalta la presencia de miembros de la familia Rab. Estas proteínas intercambiadoras de GTP participan en la formación, transporte y fusión de vesículas en la célula (Seabra y Wasmeier, 2004). La participación del sistema vesicular en el ciclo del Rotavirus es un tema que ha crecido en interés, debido a que estudios recientes vinculan el ensamblaje final de la partícula con una región externa al RE (Delmas et al., 2004). En torno a este tema, se ha propuesto que la inhibición de la expresión de la proteína viral NSP4 afecta la maduración de los viroplasmos (Silvestri et al., 2005). Esta proteína viral se encuentra distribuida, entre

otros sitios, en el ERGIC (compartimiento intermedio entre el RE y el aparato de Golgi) (Berkova et al., 2006; Xu et al., 2000). La proteína Rab1, identificada como candidato para la interacción con NSP5, participa en el transporte de vesículas del RE al aparato de Golgi (Appenzeller-Herzog y Hauri, 2006) por lo que forma parte del ERGIC. Recientemente se ha observado que VP4 también se localiza en los ERGIC (Cuadras et al., 2006). Tanto NSP4 como una porción de la proteína VP4 co-localizan con los viroplasmatas (Gonzalez et al., 2000). En nuestro trabajo hemos identificado la posible interacción de VP4 con NSP5, esto sumado a la interacción con Rab1 proponen un rol activo de NSP5 en localizar al viroplasma próximo a los ERGIC, donde ocurriría el ensamblaje final de la partícula viral.

Una de las preguntas pendientes en torno al ensamblaje del Rotavirus es como se incorpora VP4 a la partícula, ya que esta es una proteína citoplasmática que no posee una señal de localización para el RE. Se ha observado que al recubrir DLPs *in vitro* es necesario la adición primero de VP4 y luego de VP7 para formar partículas infectivas (Trask y Dormitzer, 2006). Además, se ha observado la presencia de VP4 en partículas con envoltura lipídica de Rotavirus, las cuales se localizan en el RE (Poruchynsky y Atkinson, 1991). Esto ha llevado a proponer que la incorporación de VP4 ocurre temprano, previa a la entrada al RE. La interacción de VP4 con NSP5 podría jugar un rol fundamental en este proceso.

En una segunda instancia del proyecto se realizó un análisis estructural de NSP5, específicamente de las modificaciones post-traduccionales que sufre en el contexto de la infección. Como se ha mencionado anteriormente, se ha propuesto que NSP5 es susceptible de ser fosforilada durante la infección. A fin de identificar los sitios de

fosforilación para las diferentes isoformas de NSP5 presentes en la infección, se realizó un análisis de NSP5 por medio de espectrometría de masa (MS). Así, se identificaron 9 sitios de fosforilación, además de otras modificaciones en NSP5 distribuidas a lo largo de toda la proteína (Fig. 24).

La presencia de múltiples sitios de fosforilación presentes en una isoforma de NSP5 concuerda con los resultados previos, donde al realizar un análisis en gel de 2 dimensiones de los péptidos producidos por digestión trípica de la isoforma de 28 KDa, se pudo observar varios péptidos fosforilados (Blackhall et al., 1998).

En nuestro trabajo se logró una cobertura de más del 95% de la proteína siendo el único residuo posible de ser fosforilado no analizado la serina 143. Existen varias posibilidades por las cuales esta serina no pudo ser identificada, la primera y más obvia es que los péptidos que poseen esta posición no pueden ser analizados, debido a que esta serina se encuentra en medio de una región básica lo que genera múltiple cortes con tripsina. Otra opción es que este péptido posea una modificación que afecte su estructura de tal manera que no pueda ser analizado por MS, como la de polifosfatos adheridos a esta serina, sin embargo esta clase de modificaciones no han sido identificadas en NSP5 (Afrikanova et al., 1996).

También es posible que el péptido posea una modificación que dificulte la interpretación de los espectros. En los análisis realizados se incluyeron acetilaciones, metilaciones, fosforilaciones (en residuos de serina, treonina, tirosina, cisteína e histidina), y O-Glicosilaciones (con NAG y Glucosa), sin embargo cualquier variación en la masa del péptido puede interferir la interpretación de los resultados. Pese a lo

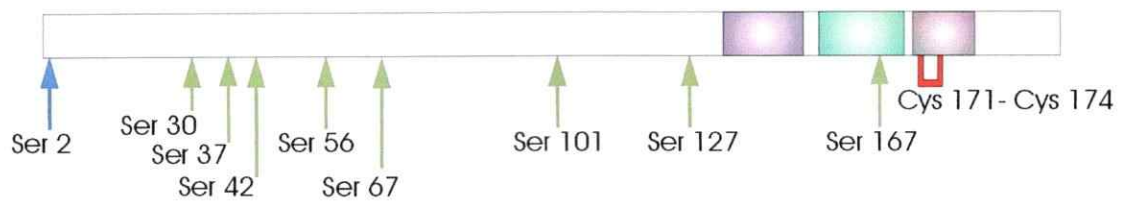


Figura 24. Esquema de modificaciones post-traduccionales identificadas en NSP5. Las modificaciones identificadas se grafican de la siguiente manera: flecha azul: acetilación, flecha verde: fosforilación, U de color rojo: puente disulfuro. Además se identifican las regiones básicas en violeta y la región ácida en verde

anteriormente expuesto esta modificación, si es que existe, debe estar presente en todas las isoformas ya que no se pudo identificar el péptido en ninguna de las isoformas de NSP5. Por lo tanto es poco probable que sea responsable de la variación en la migración de esta proteína.

Inesperadamente no se encontraron sitios específicos de fosforilación para las isoformas “más pesadas” de NSP5, indicando que las diferencias en la migración no están relacionadas con un evento específico de fosforilación. Este resultado puede ser interpretado como en desacuerdo con lo observado en estudios anteriores donde el tratamiento con fosfatasa disminuye la intensidad de las bandas presentes en las formas 28 y 35kDa, aumentando la intensidad de la forma de 26 kDa (Afrikanova et al., 1996; Poncet et al., 1997). Sin embargo, si consideramos que en el análisis de espectrometría de masas se observan los péptidos que componen la proteína por separado, es factible suponer a cada isoforma de NSP5 como una mezcla compleja de proteínas donde cada una de ellas presenta un patrón diferente de fosforilación compuesto por la combinatoria de los sitios mencionados. Ante este escenario las diferencias en la migración de NSP5 se explicarían debido a un aumento en la cantidad de fosforilaciones en diferentes posiciones más que a causa de una fosforilación específica de una posición.

Esta hipótesis concuerda con los resultados obtenidos en nuestro análisis del nivel de fosforilación de NSP5, ya que se observó un aumento en los porcentajes de fosforilación en todos los sitios analizados en la isoforma de 28 kDa al compararla con la isoforma de 26 kDa (Tabla 3 y Fig. 20). Es de notar, que los índices observados no son un resultado absoluto, ya que se ha demostrado que la técnica utilizada para la cuantificación presenta una menor sensibilidad para péptidos fosforilados (alrededor de

un 50% menos en comparación a los péptidos no fosforilados) (Krause, datos no publicados) por lo tanto es factible que los porcentajes de la Tabla 3 estén subestimados.

Esto concuerda con el resultado obtenido por otros autores donde al realizar un análisis en gel en 2 dimensiones de NSP5 no observó grandes diferencias en los puntos isoeléctricos de las variantes presentes para las isoformas de 26 kDa y 28 kDa, sin embargo se observó una mayor intensidad en las variantes mas acídicas en la forma de 28 kDa (Blackhall et al., 1997).

Se ha propuesto que la fosforilación de NSP5 surge como un balance entre la fosforilación y la desfosforilación mediada por fosfatasas celulares (Blackhall et al., 1998; Poncet et al., 1997; Torres-Vega et al., 2000). A fin de observar la dinámica de fosforilación realizamos un análisis cinético de los índices de fosforilación encontrado para algunos de los sitios en las isoformas de 26 y 28 kDa. Las posiciones estudiadas presentaron diferentes comportamientos en el tiempo. La serina 42 por ejemplo presenta un aumento en el índice de 4 a 6 h. p. i. para luego caer levemente a las 10 h. p. i. en ambas isoformas. Este resultado sugiere la acción de fosfatasas sobre esta posición en tiempos tardíos.

Las serinas 67 y 30, a diferencia de la serina 42, presentan un incremento continuo en el tiempo para la isoforma de 28 kDa con la correspondiente caída de la intensidad de 26 kDa a las 10 h. p. i., este resultado supone una evolución de las variantes con esta fosforilación de 26 a 28 kDa. Nuevamente todos los sitios analizados presentan un mayor porcentaje de fosforilación en la isoforma de 28 kDa. Esto refuerza

la hipótesis de un cambio en la migración a causa del aporte de múltiples sitios de fosforilación.

La región comprendida entre los residuos 130 al 180 ha sido propuesta como el sustrato responsable de la hiperfosforilación (Eichwald et al., 2002). En el mismo trabajo se señala a las serinas 153, 155, 164 y 166 como los blancos de las fosforilaciones responsables de la alteración en la migración de NSP5. En nuestro análisis encontramos solo a la serina 164 fosforilada, presentando un alto índice de fosforilación. La serina 166 no se observó fosforilada pese a encontrarse en el mismo péptido que la serina 164. Las otras 2 serinas fueron identificadas en un péptido obtenido con el corte con tripsina y quimiotripsina, el cual no presenta fosforilaciones. La diferencia con los resultados obtenidos en el trabajo anterior, puede deberse a que en ese estudio se utilizaron mutantes de delección, esta alteración en la estructura en la molécula puede exponer o facilitar el acceso de quinasas a estos residuos.

La serina 164 se encuentra en una región muy ácida que se ha implicado en la interacción con una hendidura básica en la proteína NSP2 (Jiang et al., 2006). Nuestros resultados muestran que este residuo se encuentra altamente fosforilado (Tabla 3). Esta modificación puede acrecentar la afinidad por NSP2, al aumentar las cargas negativas en la región. Al comparar las secuencias de NSP5 de diferentes cepas de Rotavirus pudimos observar que esta serina se encuentra conservada dentro del grupo A, además es reemplazada por un residuo de glutamato en el grupo C (Fig. 23), lo que puede ser considerada una mutación conservativa al considerarla fosforilada.

Esta serina se encuentra dentro de un consenso característico para CKII. Mutantes de delección de NSP5 han sido fosforiladas por esta quinasa *in vitro* en esa

región, en el mismo estudio, la mutante de serina por alanina para las posiciones 153, 155, 164 y 166 no fueron fosforiladas. Sin embargo no se reporta la mutante específica para la posición 164 (Eichwald et al., 2002). En la proteína NS2 del virus Blue Tongue, la cual se ha se ha propuesto sería un híbrido entre NSP2 y NSP5 (Horscroft y Roy, 2000), se ha observado que la multimerización y la formación de estructuras tipo viroplasma son dependientes de la fosforilación por CKII de las serinas 249 y 259 (Modrof et al., 2005). Es interesante notar que los sitios de fosforilación identificados en NS2 y la serina 164 en NSP5 se encuentran en regiones ácidas en sus respectivas moléculas.

Recientemente se ha propuesto un modelo donde la interacción de NSP5 con NSP2 llevaría a la fosforilación de la serina 67 por CKI, induciendo la hiperfosforilación (Eichwald et al., 2004a). Este modelo es actualmente discutido por otros autores que han logrado hiperfosforilar a NSP5 en mutantes donde se reemplazó esta serina por alanina (Sen et al., 2006). En nuestro trabajo hemos observado a la serina 67 fosforilada en un bajo porcentaje en todas las isoformas de NSP5. Si la fosforilación de esta serina es la responsable de la hiperfosforilación (cambio de la migración de NSP5) debería de observarse solo en las isoformas “pesadas” (28 al 35 kDa), por lo que supone la necesidad de otros factores para la hiperfosforilación además de la serina 67. Por otro lado, el alto grado de conservación de secuencia no solo en la posición 67 sino también en las secuencias adyacentes (Fig. 23) y la baja similitud entre las proteínas del grupo A y C (alrededor de un 20 %), sugieren un rol importante para este residuo en la función de NSP5.

Como se ha mencionado anteriormente el estudio de modificaciones teóricas en NSP5, permitió identificar modificaciones no descritas para esta proteína.

Una de ellas es la acetilación en el N-terminal de la serina 2 con la correspondiente pérdida de la metionina 1 (Fig. 21). En células eucariontes, alrededor de un 50% a un 80% de las proteínas poseen esta modificación. Esto ocurre durante el proceso de traducción donde se procede a eliminar la metionina 1 seguido por la acetilación del residuo presente en la posición 2 (Polevoda y Sherman, 2000). La función biológica de esta modificación no es clara aún, en algunos casos afecta significativamente las funciones moleculares tales como ensamblaje, interacción con otras proteínas o protección de la degradación, mientras que en otros casos parece no tener una función definida. El 40% de las proteínas acetiladas en el N-terminal son proteínas estructurales lo que es bastante interesante, si consideramos que NSP5 se ha propuesto como una proteína que participa en el andamiaje de los viroplasmos.

El análisis de secuencia entre los grupos A, B y C de Rotavirus demuestra que la serina en la posición 2 es altamente conservada, además la única variante encontrada es una sustitución por alanina, aminoácido también susceptible de ser acetilado por la misma Acetiltransferasa responsable de acetilar serinas (Polevoda y Sherman, 2000) (datos no mostrados).

La presencia de un puente disulfuro intracadena en NSP5 es un resultado particularmente interesante. Esta modificación se encuentra en la región carboxiterminal de la proteína, la cual se ha propuesto participa en la interacción con NSP2 (Eichwald et al., 2004b; Jiang et al., 2006). Es interesante notar que sólo dos aminoácidos se encuentran entre las cisteínas que forman el puente disulfuro por lo que

para que ambas interactúen debe ocurrir un “*bending*” de la molécula formando, lo que se denomina un anillo disulfuro de 14 miembros (Ren et al., 1998). Si consideramos que esta estructura se encuentra en el límite entre una región ácida y una región básica (Fig. 24.) es factible proponer que el puente disulfuro permite estabilizar una conformación en esta región de la proteína.

Este puente disulfuro se encuentra dentro de un motivo CXXC, el cual es característico del sitio activo de la superfamilia de las tiol-oxidoreductasas, (Rietsch y Beckwith, 1998), que incluye a las tioltransferasas, tioredoxinas, glutaredoxin y protein-disulfuro isomerasas. Este motivo es siempre seguido por una estructura alfa hélice en las tiol-oxidoreductasas. Cuando realizamos una predicción de la estructura de NSP5 se observó la presencia de una alfa hélice en el extremo C-terminal cercano al puente disulfuro (Fig. 23). Sin embargo al realizar una comparación de secuencia entre diferentes dominios tipo tioredoxina y NSP5 se observó una similitud menor a un 10%, por lo que no fue posible modelar utilizando este dominio como matriz.

Se ha observado que los residuos que separan las dos cisteínas influyen significativamente los potenciales redox y el valor de pKa de las cisteínas en los motivos CXXC, afectando su capacidad de formar puentes disulfuro (Chivers et al., 1996; Chivers et al., 1997). En NSP5 no solo las cisteínas que forman el puente disulfuro sino los aminoácidos entre ellas se encuentran altamente conservados entre los grupos A y C. Estos resultados nos llevan a la conclusión de que el puente disulfuro intramolecular es altamente conservado y sugiere una participación en la función de NSP5. Cabe destacar que ninguna de las dos cisteínas son necesarias para la multimerización de NSP5 (Torres-Vega et al., 2000). Varias funciones son atribuibles

al puente disulfuro encontrado en NSP5 desde estabilizar una conformación de la proteína, hasta actuar como un regulador redox en el viroplasma, futuros estudios permitirían identificar la función de esta modificación.



PERSPECTIVAS.

Durante el desarrollo de esta tesis han surgido varias preguntas en torno a las funciones de NSP5. Una de ellas es el mecanismo inhibitorio de NSP5 sobre la infección. La inhibición en momentos tempranos, además de la interacción de NSP5 con proteínas ribosomales suponen un efecto de NSP5 sobre la traducción. El efecto de NSP5 sobre la traducción tanto de mensajeros virales como celulares, es un tema a ser analizado en el futuro.

Además en nuestros ensayos de co-precipitación se han obtenido varios candidatos interesantes que interactuarían con NSP5, particularmente la interacción de NSP5 con VP4 y Rab1 plantea un posible rol de NSP5 en la localización del viroplasma en el ERGIC sugiriendo a este sitio como el lugar donde ocurriría el ensamblaje final de la partícula. Recientemente se ha observado que el Rotavirus es capaz de salir de la célula por medio de un mecanismo de exocitosis no convencional, el cual evitaría el paso por el Golgi y en el que participarían *rafts* y VP4. La proteína Rab 11a participa en transporte de vesículas desde el endosoma hacia la membrana plasmática, al identificar esta proteína como candidato para la interacción con NSP5 surge la pregunta ¿NSP5 permitiría conectar el ensamblaje final de la partícula con el posicionamiento en una vía de salida la cual permitiría evitar el paso por el Golgi?

No de menor importancia es el haber identificado la interacción NSP5 y VP4 ya que plantea la hipótesis de un rol activo de NSP5 en la incorporación de esta proteína a la partícula viral.

El sistema de expresión desarrollado y las modificaciones identificadas en el análisis por MS de NSP5 permitirán en un futuro ensayar el rol funcional de estas modificaciones, por ejemplo en la multimerización, interacción con otras proteínas virales o con las proteínas celulares identificadas. Dentro de las modificaciones identificadas nos parece de principal interés el rol del puente disulfuro identificado surgiendo preguntas tales como: ¿esta modificación permite estabilizar la conformación determinada?, ¿es posible que NSP5 participe regulando el equilibrio redox?, ¿NSP5 afecta el equilibrio redox celular?, entre otras.

CONCLUSIONES.

- La presencia de trNSP5 en la célula inhibe la infección por Rotavirus en un momento temprano de la infección. trNSP5 no afecta la actividad transcripcional de la DLP por lo que el efecto inhibitorio se circunscribe a un periodo posterior a la síntesis de mRNA por la DLP-PP y previo a la formación de viroplasma.
- Debido a la presencia del efecto inhibitorio de trNSP5 se requerirá un sistema finamente regulado de expresión de NSP5 para trans-complementar células.
- NSP5 es fosforilada en varios residuos de serina durante la infección, pese a ello ningún sitio específico se asocia con un cambio en la migración de NSP5. Por lo tanto sólo es posible explicar las diferencias en la migración de esta proteína si consideramos a cada isoforma de NSP5 como una mezcla compleja compuesta por moléculas fosforiladas en diferentes posiciones.
- La serina 164 presenta un alto porcentaje de fosforilación, por lo que el grupo fosfato puede aumentar la acidez de la región C-terminal de NSP5 y modular así la interacción NSP2.
- Se observó a la serina 67 fosforilada y conservada entre cepas, sin embargo al estar esta modificación presente en todas las isoformas de NSP5 (incluyendo la isoforma de 26 KDa), no se la puede atribuir como única responsable de inducir la hiperfosforilación.
- La serina 2 se encuentra acetilada y conservada entre cepas de los grupos A, B y C de Rotavirus.

- Existe un puente disulfuro intracadena en un motivo CXXC, el cual probablemente induce un "*bending*" de la molécula. Éste se encuentra conservado entre cepas de Rotavirus.

BIBLIOGRAFÍA.

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.

Afrikanova, I., Miozzo, M. C., Giambiagi, S., and Burrone, O. (1996). Phosphorylation generates different forms of rotavirus NSP5. *J Gen Virol* 77, 2059-2065.

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.

Appenzeller-Herzog, C., and Hauri, H. P. (2006). The ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC): in search of its identity and function. *J Cell Sci* 119, 2173-2183.

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.

Barro, M., Mandiola, P., Chen, D., Patton, J. T., and Spencer, E. (2001). Identification of sequences in rotavirus mRNAs important for minus strand synthesis using antisense oligonucleotides. *Virology* 288, 71-80.

Becker, M. M., Peters, T. R., and Dermody, T. S. (2003). Reovirus sigma NS and mu NS proteins form cytoplasmic inclusion structures in the absence of viral infection. *J Virol* 77, 5948-5963.

Berkova, Z., Crawford, S. E., Trugnan, G., Yoshimori, T., Morris, A. P., and Estes, M. K. (2006). Rotavirus NSP4 induces a novel vesicular compartment regulated by calcium and associated with viroplasms. *J Virol* 80, 6061-6071.

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.

Blackhall, J., Fuentes, A., Hansen, K., and Magnusson, G. (1997). Serine protein kinase activity associated with rotavirus phosphoprotein NSP5. *J Virol* 71, 138-144.

Blackhall, J., Munoz, M., Fuentes, A., and Magnusson, G. (1998). Analysis of rotavirus nonstructural protein NSP5 phosphorylation. *J Virol* 72, 6398-6405.

Broering, T. J., Kim, J., Miller, C. L., Piggott, C. D., Dinoso, J. B., Nibert, M. L., and Parker, J. S. (2004). Reovirus nonstructural protein mu NS recruits viral core surface proteins and entering core particles to factory-like inclusions. *J Virol* 78, 1882-1892.

- 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* 86, 1481-1487.
- Chivers, P. T., Laboissiere, M. C., and Raines, R. T. (1996). The CXXC motif: imperatives for the formation of native disulfide bonds in the cell. *EMBO J* 15, 2659-2667.
- Chivers, P. T., Prehoda, K. E., and Raines, R. T. (1997). The CXXC motif: a rheostat in the active site. *Biochemistry* 36, 4061-4066.
- Chnaiderman, J., Barro, M., and Spencer, E. (2002). NSP5 phosphorylation regulates the fate of viral mRNA in rotavirus infected cells. *Arch Virol* 147, 1899-1911.
- Cuadras, M. A., Bordier, B. B., Zambrano, J. L., Ludert, J. E., and Greenberg, H. B. (2006). Dissecting rotavirus particle-raft interaction with small interfering RNAs: insights into rotavirus transit through the secretory pathway. *J Virol* 80, 3935-3946.
- Cuff, J. A., Clamp, M. E., Siddiqui, A. S., Finlay, M., and Barton, G. J. (1998). JPred: a consensus secondary structure prediction server. *Bioinformatics* 14, 892-893.
- Delmas, O., Gardet, A., Chwetzoff, S., Breton, M., Cohen, J., Colard, O., Sapin, C., and Trugnan, G. (2004). Different ways to reach the top of a cell. Analysis of rotavirus assembly and targeting in human intestinal cells reveals an original raft-dependent, Golgi-independent apical targeting pathway. *Virology* 327, 157-161.
- 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 U S A* 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 *Fields Virology*, D. Knipe, and P. Howley, eds. (Philadelphia, PA, Lippincott Williams & Wilkins), pp. 1747-1785.
- Fabbretti, E., Afrikanova, I., Vascotto, F., and Burrone, O. R. (1999). Two non-structural rotavirus proteins, NSP2 and NSP5, form viroplasm-like structures in vivo. *J Gen Virol* 80 (Pt 2), 333-339.
- Gallegos, C. O., and Patton, J. T. (1989). Characterization of rotavirus replication intermediates: a model for the assembly of single-shelled particles. *Virology* 172, 616-627.

- Lopez, S., and Arias, C. F. (2004). Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. *Trends Microbiol* 12, 271-278.
- Lopez, T., Rojas, M., Ayala-Breton, C., Lopez, S., and Arias, C. F. (2005). Reduced expression of the rotavirus NSP5 gene has a pleiotropic effect on virus replication. *J Gen Virol* 86, 1609-1617.
- Mangeot, P. E., Negre, D., Dubois, B., Winter, A. J., Leissner, P., Mehtali, M., Kaiserlian, D., Cosset, F. L., and Darlix, J. L. (2000). Development of minimal lentivirus vectors derived from simian immunodeficiency virus (SIVmac251) and their use for gene transfer into human dendritic cells. *J Virol* 74, 8307-8315.
- 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.
- Mirazimi, A., Magnusson, K. E., and Svensson, L. (2003). A cytoplasmic region of the NSP4 enterotoxin of rotavirus is involved in retention in the endoplasmic reticulum. *J Gen Virol* 84, 875-883.
- Modrof, J., Lymperopoulos, K., and Roy, P. (2005). Phosphorylation of bluetongue virus nonstructural protein 2 is essential for formation of viral inclusion bodies. *J Virol* 79, 10023-10031.
- Mohan, K. V., Muller, J., Som, I., and Atreya, C. D. (2003). 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.
- Montero, H., Arias, C. F., and Lopez, S. (2006). Rotavirus Nonstructural Protein NSP3 is not required for viral protein synthesis. *J Virol* 80, 9031-9038.
- O'Brien, J. A., Taylor, J. A., and Bellamy, A. R. (2000). Probing the structure of rotavirus NSP4: a short sequence at the extreme C terminus mediates binding to the inner capsid particle. *J Virol* 74, 5388-5394.
- Parashar, U. D., Hummelman, E. G., Bresee, J. S., Miller, M. A., and Glass, R. I. (2003). Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis* 9, 565-572.
- Patton, J. T., and Gallegos, C. O. (1988). Structure and protein composition of the rotavirus replicase particle. *Virology* 166, 358-365.
- Patton, J. T., and Gallegos, C. O. (1990). Rotavirus RNA replication: single-stranded RNA extends from the replicase particle. *J Gen Virol* 71 (Pt 5), 1087-1094.
- Patton, J. T., and Spencer, E. (2000). Genome replication and packaging of segmented double-stranded RNA viruses. *Virology* 277, 217-225.
- 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.

- 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.
- Piron, M., Delaunay, T., Grosclaude, J., and Poncet, D. (1999). Identification of the RNA-binding, dimerization, and eIF4GI-binding domains of rotavirus nonstructural protein NSP3. *J Virol* 73, 5411-5421.
- Piron, M., Vende, P., Cohen, J., and Poncet, D. (1998). Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4GI and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F. *EMBO J* 17, 5811-5821.
- Polevoda, B., and Sherman, F. (2000). Nalpha -terminal acetylation of eukaryotic proteins. *J Biol Chem* 275, 36479-36482.
- Poncet, D., Aponte, C., and Cohen, J. (1993). Rotavirus protein NSP3 (NS34) is bound to the 3' end consensus sequence of viral mRNAs in infected cells. *J Virol* 67, 3159-3165.
- 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 viroplasm. *J Virol* 71, 34-41.
- Poruchynsky, M. S., and Atkinson, P. H. (1991). Rotavirus protein rearrangements in purified membrane-enveloped intermediate particles. *J Virol* 65, 4720-4727.
- 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, 471-473.
- Prasad, B. V., Wang, G. J., Clerx, J. P., and Chiu, W. (1988). Three-dimensional structure of rotavirus. *J Mol Biol* 199, 269-275.
- Rasband, W. S. (1997). ImageJ. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>.
- Ren, B., Tibbelin, G., de Pascale, D., Rossi, M., Bartolucci, S., and Ladenstein, R. (1998). A protein disulfide oxidoreductase from the archaeon *Pyrococcus furiosus* contains two thioredoxin fold units. *Nat Struct Biol* 5, 602-611.
- Rietsch, A., and Beckwith, J. (1998). The genetics of disulfide bond metabolism. *Annu Rev Genet* 32, 163-184.
- Sambrook J.F., F. E., Maniatis T, (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2 edn, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sandino, A. M., Jashes, M., Faundez, G., and Spencer, E. (1986). Role of the inner protein capsid on in vitro human rotavirus transcription. *J Virol* 60, 797-802.
- Seabra, M. C., and Wasmeier, C. (2004). Controlling the location and activation of Rab GTPases. *Curr Opin Cell Biol* 16, 451-457.

- Sen, A., Agresti, D., and Mackow, E. R. (2006). Hyperphosphorylation of the rotavirus NSP5 protein is independent of serine 67, [corrected] NSP2, or [corrected] the intrinsic insolubility of NSP5 is regulated by cellular phosphatases. *J Virol* *80*, 1807-1816.
- Silvestri, L. S., Taraporewala, Z. F., and Patton, J. T. (2004). Rotavirus replication: plus-sense templates for double-stranded RNA synthesis are made in viroplasm. *J Virol* *78*, 7763-7774.
- Silvestri, L. S., Tortorici, M. A., Vasquez-Del Carpio, R., and Patton, J. T. (2005). Rotavirus glycoprotein NSP4 is a modulator of viral transcription in the infected cell. *J Virol* *79*, 15165-15174.
- Singh, D. (2003). Initiative will fast-track vaccine for childhood diarrhoea in developing world. *Bmj* *326*, 354.
- Stacy-Phipps, S., and Patton, J. T. (1987). Synthesis of plus- and minus-strand RNA in rotavirus-infected cells. *J Virol* *61*, 3479-3484.
- Strauss EG, S. J., Levine AJ. (2001). Virus Evolution. In *Fields Virology*, D. Knipe, and P. Howley, eds. (Philadelphia, PA, Lippincott Williams & Wilkins), pp. 153-172.
- 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. 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. F., Schuck, P., Ramig, R. F., Silvestri, L., and Patton, J. T. (2002). Analysis of a temperature-sensitive mutant rotavirus indicates that NSP2 octamers are the functional form of the protein. *J Virol* *76*, 7082-7093.
- Torres-Vega, M. A., Gonzalez, R. A., Duarte, M., Poncet, D., Lopez, 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.
- Touris-Otero, F., Martinez-Costas, J., Vakharia, V. N., and Benavente, J. (2004). Avian reovirus nonstructural protein microNS forms viroplasm-like inclusions and recruits protein sigmaNS to these structures. *Virology* *319*, 94-106.
- Trask, S. D., and Dormitzer, P. R. (2006). Assembly of highly infectious rotavirus particles recoated with recombinant outer capsid proteins. *J Virol* *80*, 11293-11304.
- Vascotto, F., Campagna, M., Visintin, M., Cattaneo, A., and Burrone, O. R. (2004). Effects of intrabodies specific for rotavirus NSP5 during the virus replicative cycle. *J Gen Virol* *85*, 3285-3290.

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.

Xu, A., Bellamy, A. R., and Taylor, J. A. (2000). Immobilization of the early secretory pathway by a virus glycoprotein that binds to microtubules. *EMBO J* 19, 6465-6474.

