

UCH-FC  
DOC-B  
C 544  
C. 1

**REGULACIÓN DEL CICLO REPLICATIVO DE ROTAVIRUS:  
el papel de la proteína no estructural NSP5**

Tesis

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Doctor en Ciencias con mención en Biología

Facultad de Ciencias

por

Jonás Francisco Chnaiderman Figueroa

Noviembre, 1999

Director de Tesis: Dr. Eugenio Spencer Ossa



**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**INFORME DE APROBACIÓN**  
**TESIS DE DOCTORADO**

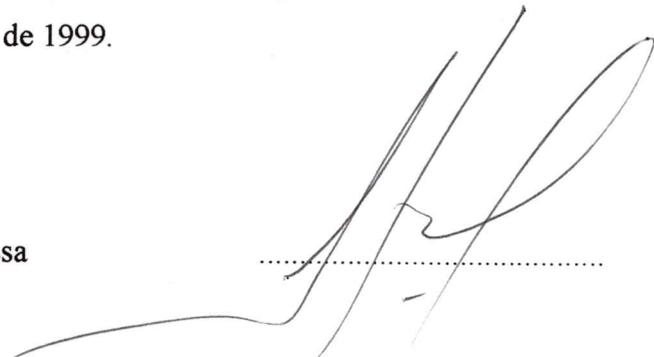
Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

**JONÁS FRANCISCO CHNAIDERMAN FIGUEROA**

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 7 de octubre de 1999.

Director de Tesis:

Dr. Eugenio Spencer Ossa



.....

Comisión de Evaluación de Tesis:

Dra. Margarita Carú



.....

Dr. Jorge Allende

.....

Dr. Juan Kuznar

.....



**A Claudia.**

**Esto existe gracias a tu paciencia...**

Lo que puede el sentimiento no lo ha podido el saber,  
ni el más ancho proceder, ni el más claro pensamiento...

Violeta Parra



## AGRADECIMIENTOS

Mis padres, cada uno a su manera, forjaron en mi la voluntad de enfrentar desafíos como el que significó esta tesis. Por eso, además de tantas otras cosas, gracias a ustedes.

A mi mujer, que ha entendido y apoyado esta opción –una opción tan egoísta a veces–, que me ha levantado en los momentos duros, que mantiene vivo mi espíritu lúdico.

A Eugenio, más que un tutor, un formador de personalidad. Gracias.

A Mario Barro, amigo y maestro del cotidiano. Somos la prueba de que las ideas de extremos opuestos terminan uniéndose en función del equilibrio.

A Ana María Sandino, de quien aprendí a estrujar el tiempo y a ser más crítico.

A John Patton, que me abrió las puertas de su laboratorio sin imaginarse el riesgo que corría. Además, a los amigos del NIH, que me enseñaron muchísimo: Dayue Chen, Vladimir Chizikov, Zenobia Taraporewala y Melinda Jones.

A María Teresa Castillo, LA Técnico que todos soñamos tener algún día.

A todos los colegas que acompañaron este embarazo y parto: Javier, José Luis, Paola, Marcela, Andrea, Bernardita, Juan Antonio, Lilian, Andrés, Johanna, William, y Alberto. Amigos, somos demasiado monolíticos... gracias por eso.

A Don Oscar, cuyo apoyo fue esencial.

Indispensable fue el apoyo dado por CONICYT a través de proyectos FONDECYT (2970012 y 4990022) y de la beca de doctorado.

A tantas personas que me apoyaron, que colaboraron de tantas maneras. Gracias.

Ah! Por supuesto, gracias también a Mariel y Orlando.



## ÍNDICE DE MATERIAS

	Pag.
1. ABREVIATURAS	xi
2. RESUMEN	xii
3. SUMMARY	xv
4. INTRODUCCIÓN	1
4.1. Generalidades.	1
4.2. Estructura.	1
4.3. Ciclo infeccioso.	3
4.4. Aspectos patogénicos e inmunológicos.	6
4.5. Variabilidad genética.	7
4.6. Proteínas no estructurales.	9
4.7. NSP5.	11
4.8. Antecedentes de presente trabajo.	12
5. MATERIALES	17
5.1. Reactivos.	17



5.2.	Soluciones.	17
5.3.	Partidores.	18
5.4.	Otros.	18
6.	MÉTODOS	19
6.1.	Cultivo celular.	19
6.1.1.	Células MA-104.	19
6.1.2.	Células Sf-9	19
6.1.3	<i>Escherichia coli</i> .	19
6.2.	Infección y propagación de cepas virales	19
6.2.1.	Rotavirus.	19
6.2.2.	Baculovirus.	20
6.3.	Marcación de cultivos con radioisótopos.	21
6.4.	Análisis de macromoléculas.	21
6.5.	Expresión de NSP5	22
6.5.1.	Clonamiento de las variantes de NSP5	22
6.5.2	Subclonamiento y expresión en bacterias.	25
6.5.3.	Sobclonamiento y expresión en baculovirus.	25
6.6.	Secuenciamientos y análisis.	26

6.7.	<b>Inmunofluorescencia</b>	27
6.8.	<b>Ensayos de NSP5 <i>in vitro</i></b>	28
6.8.1.	<b>Purificación de NSP5 expresada en <i>E. coli</i>.</b>	28
6.8.2.	<b>Inmunoprecipitación.</b>	28
6.8.3.	<b>Modificaciones <i>in vitro</i>.</b>	28
6.9.	<b>Análisis cuantitativo de radioemisiones.</b>	29
7.	<b>RESULTADOS</b>	30
7.1.	<b>SA11 vs. SACC11: comparaciones iniciales.</b>	30
7.1.1.	<b>Secuenciamiento y análisis del segmento 11 reordenado en SACC11.</b>	30
7.1.2.	<b>Comparación directa: eficiencia en co-infección</b>	33
7.1.3.	<b>Localización de NSP5 en los viroplasmata.</b>	35
7.2.	<b>Análisis comparativo de macromoléculas en células infectadas.</b>	35
7.2.1.	<b>Análisis de subpartículas virales.</b>	35
7.2.2.	<b>Cinética de síntesis de proteínas.</b>	38
7.2.3.	<b>RNA genómico.</b>	38
7.2.4.	<b>Mensajeros virales.</b>	41
7.3.	<b>La proteína no estructural NSP5</b>	46
7.3.1.	<b>Inmunoprecipitación.</b>	46

7.3.2.	Expresión de NSP5 en <i>E. coli</i> .	48
7.3.3.	Expresión de NSP5 en células de insecto.	52
7.3.4.	Ensayos de fosforilación de NSP5	55
7.3.5	Defosforilación de NSP5	57
7.4.	Efecto de inhibidores de modificaciones post-traduccionales en las infecciones.	60
8.	DISCUSIÓN.	64
9.	CONCLUSIONES	77
10.	BIBLIOGRAFÍA	78

**LISTA DE TABLAS**

	<b>Pag.</b>
<b>1. Modificaciones post-traduccionales esperadas en cada variante de NSP5.</b>	<b>32</b>
<b>2. Características estudiadas en las cepas SA11 y SACC11</b>	<b>74</b>

## LISTA DE FIGURAS

	Pag.
1. Principales características de la cepa prototipo SA11.	2
2. Principales eventos durante el ciclo infectivo de Rotavirus.	5
3. Rearreglo genético del segmento 11.	13
4. Ensayos de placas de las cepas estudiadas.	15
5. Diagrama de clonamientos y subclonamientos para la expresión de NSP5.	23
6. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas deducidas de las variantes de NSP5.	31
7. Ensayo de co-infección entre las cepas SA11 y SACC11.	34
8. Localización de NSP5 en células infectadas.	36
9. Síntesis de subpartículas virales a distintos tiempos.	37
10. Cinética comparada de síntesis de proteínas.	39
11. Análisis cuantitativo de la síntesis proteica.	40
12. Cinética de la síntesis de RNA genómico viral.	42
13. Cuantificación de la síntesis de RNA genómico viral.	43
14. Detección de mensajeros virales.	44

15.	Cuantificación de mensajeros virales.	45
16.	Inmunoprecipitación de NSP5 proveniente de infecciones.	47
17.	Clonamiento de los segmentos 11: selección por PCR.	49
18.	Inducción de la expresión de NSP5 en <i>E. coli</i> .	51
19.	Purificación de la proteína de fusión HIS/NSP5.	53
20.	Clonamiento en Baculovirus: detección por PCR de la transposición.	54
21.	Expresión de NSP5 en células de insecto.	56
22.	Ensayo de actividad quinasa	57
23.	Remoción enzimática de los grupos fosfato de NSP5.	59
24.	Efecto de inhibidores de modificaciones post-traduccionales .	61
25.	Efecto del inhibidor de quinasas H-7 en la síntesis de proteínas virales.	62
26	Modelo de regulación ejercida por NSP5 en el ciclo infectivo.	76

## ABREVIATURAS

dsRNA	: RNA de doble hebra.
DTT	: Ditioneitol.
EDTA	: Ácido etilendiaminotetraacético.
h.p.i.	: Horas post-infección.
MEM	: Medio mínimo de EAGLE.
M.O.I.	: Multiplicidad de infección.
O.D. <sub>600</sub>	: Densidad óptica a 600 nm.
PAGE	: Electroforesis en gel de poliacrilamida.
PCR	: Reacción de polimerasa en cadena.
RT	: Transcriptasa reversa.
SDS	: Dodecil sulfato de sodio.
SFB	: Suero fetal bovino.
u.f.p./cél.	: Unidades formadoras de placas por célula.

## RESUMEN

Rotavirus, miembro de la familia *Reoviridae*, es el principal agente etiológico de diarrea en niños menores de seis meses. Las propiedades estructurales y fisiológicas de Rotavirus han llevado a muchos laboratorios a la búsqueda de una vacuna efectiva; recientemente fue aprobado el uso masivo de una vacuna atenuada que comprende cuatro de los serotipos más comunes.

El actual conocimiento del ciclo infeccioso no ha permitido aún establecer un sistema de genética reversa, pues no hay un sistema por el cual introducir en una partícula infectiva ácidos nucleicos previamente manipulados. El genoma de Rotavirus está constituido por 11 segmentos de RNA de doble hebra y tiene una compleja cápside compuesta por tres cubiertas proteicas. La replicación y el empaquetamiento viral han sido estudiados tanto en sistemas *in vivo* como *in vitro* y se ha establecido un papel importante a las proteínas no estructurales en estos procesos. Sin embargo, no está claro cuáles serían las funciones de cada una de estas proteínas en el contexto del ciclo infeccioso. Algunas de ellas tienen afinidad por RNA y se han propuesto algunas interacciones con otras proteínas.

NSP5 es la única proteína viral fosforilada y esta característica sugiere una función regulatoria en la morfogénesis del virus. Además, se ha demostrado que esta proteína está O-glicosilada y tiene una actividad auto-protein-quinasa. El objetivo central de esta tesis ha sido determinar el posible rol regulatorio de esta proteína y correlacionarla con análisis moleculares hechos en el modelo de infección en cultivos

celulares. El enfoque utilizado en este estudio consistió en el análisis de una cepa reordenante (SACC11), portadora de una variante heteróloga de NSP5 en un fondo genético conocido (SA11). Trabajos anteriores habían mostrado que la cepa SACC11 tiene fenotipos característicos tales como el de "placa grande" y el de "sobrecrecimiento" de la cepa parental SA11. A partir de estos datos se realizaron análisis moleculares más detallados.

Al comparar la cinética de síntesis de macromoléculas, se demostró que la cepa SACC11 produce mRNA, proteínas y subpartículas virales a tiempos más tempranos que su parental SA11. Estos resultados explicarían la mayor eficiencia observada en ensayos de placas y durante co-infecciones. Curiosamente, la síntesis de dsRNA genómico es posterior en la cepa SACC11, sugiriendo una regulación negativa del proceso de replicación.

Además, se efectuaron comparaciones de tipo bioquímico entre las dos variantes de NSP5, la estudiada anteriormente proveniente de SA11 (p-NSP5) y la heteróloga (h-NSP5). Ambas variantes fueron expresadas en sistemas procariontes y eucariontes y usadas para identificar características como actividad quinasa, susceptibilidad a fosfatasa, movilidad electroforética e interacciones con otros polipéptidos virales. Los resultados apuntan a diferencias estructurales entre ambas variantes que hacen a h-NSP5 más susceptible a la acción de fosfatasa. Esta característica permite sugerir diferencias en lo que a interacciones con otras proteínas virales se refiere.

Utilizando un inhibidor de quinasas en ensayos de infección con ambas cepas, se encontró que cambios en el grado de fosforilación de NSP5 modifican la cinética de

síntesis de proteínas. Este hallazgo, junto a los resultados antes descritos, permite la proposición de un modelo para el papel de NSP5 en el ciclo infectivo de Rotavirus, que se ajusta a los datos que la literatura muestra en este contexto. Dado que los mensajeros virales participan tanto en el proceso de traducción como en el de la síntesis del dsRNA genómico, probablemente NSP5 es el regulador que direcciona al mRNA a uno u otro proceso, dependiendo del grado de fosforilación de esta proteína no estructural.

## SUMMARY

Rotavirus, a member of the *Reoviridae* family, is the main viral etiological agent of diarrhoea in children under the age of six months. The structural and physiological properties of Rotavirus have prompted many laboratories to search for an effective vaccine and an attenuated vaccine covering four of the most common serotypes was recently approved for the massive use.

The current understanding of the infective cycle of Rotavirus had not revealed an easy way to establish a reverse genetic system because there is not a system to build an infective virion from engineered nucleic acids. Its genome consists of 11 segments of dsRNA and it has a highly structured capsid of three layers of proteins. The replication and packaging of the virus has been studied in detail *in vivo* and *in vitro* and it has been established that the non-structural proteins (NSP) play an important role in these processes. Nevertheless, the individual functions of these proteins in the viral cycle have not been elucidated. Some NSP have RNA affinity and some protein-protein interactions have been proposed.

NSP5 is the only phosphorylated viral protein and this property suggests a regulatory function in viral morphogenesis. It has been shown that this protein is O-glycosylated and has an auto-kinase activity. The main objective of this work was to investigate whether this protein played a regulatory role and, if so, to attempt to correlate it with the molecular analysis of infections in the cells monolayer system. The approach used was the analysis of a reassortant strain (SACC11) that harbours a heterologous

variant of NSP5 in a known genetic background (SA11). Previous work showed that the SACC11 strain has phenotypes, named "big-plaque" and "overgrowth" that can distinguish it from the parental SA11 strain.

Comparing the macromolecular synthesis kinetics it was shown that the SACC11 strain synthesises mRNA, proteins and viral subparticles at early times than SA11. These characteristics could explain the higher efficiency seen in plaque and co-infections assays. Surprisingly, the synthesis of the dsRNA genome was delayed in the SACC11 strain, suggesting a negative regulation of the genome replication event.

Additionally, biochemical comparisons were made of NSP5 from strain SA11 (p-NSP5) and the NSP5 from strain SACC11 (h-NSP5). Both types of NSP5 were expressed in prokaryote and eukaryote systems and were assayed for kinase activity, phosphatase susceptibility, electrophoretic mobility and interactions with viral polypeptides. The results show that there are structural differences between the NSP5s that make the h-NSP5 less susceptible to the action of phosphatase. This property could have an effect on the interactions of h-NSP5 with other viral proteins.

The use of a kinase inhibitor in infection assays showed that changes in the phosphorylation degree of NSP5 alters the kinetics of protein synthesis. This discovery and the previous results suggest a unique model for the role of NSP5 in the viral cycle. Since the viral mRNA molecules are involved in two of the main events of the viral cycle, namely translation and replication of the viral genome, it is possible that NSP5 is a regulator that directs the mRNA to one of these processes, depending on its degree of phosphorylation.

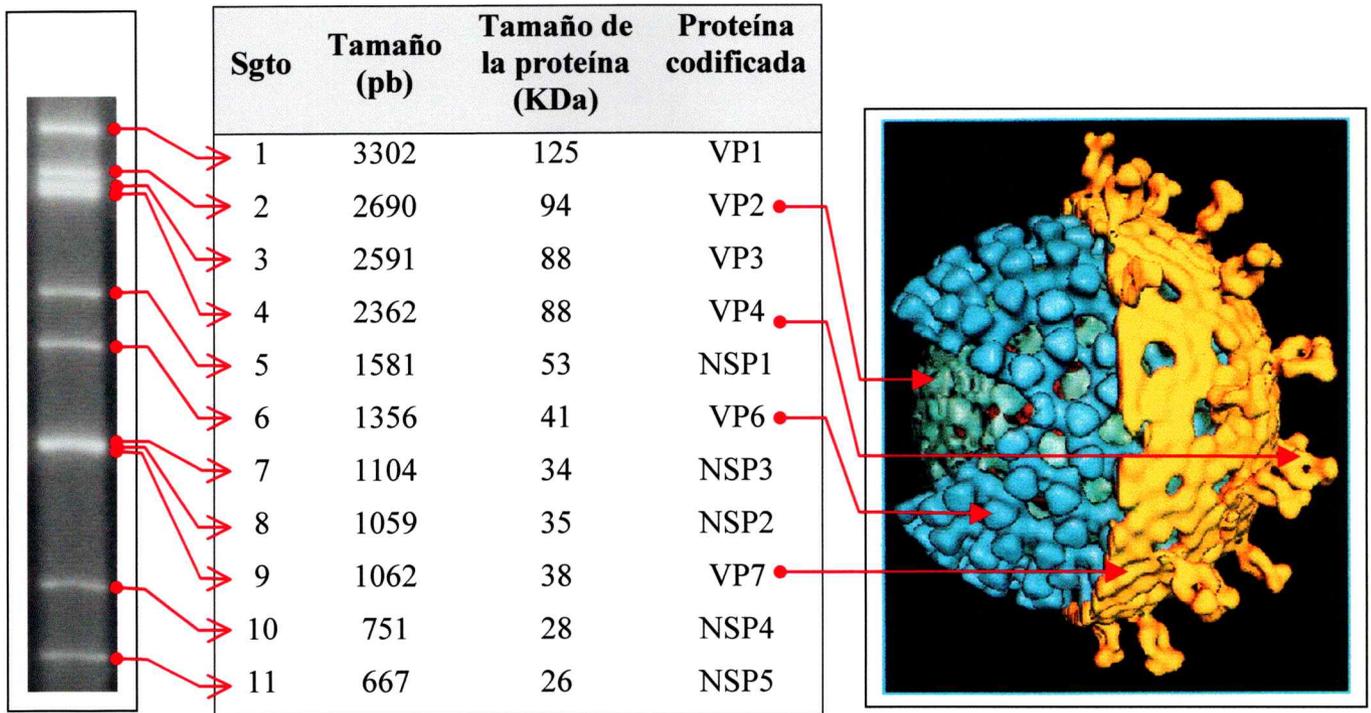
## INTRODUCCIÓN

### 1.- Generalidades.

Entre los diversos patógenos causantes de diarrea en humanos, Rotavirus (familia *Reoviridae*) es el principal agente viral, siendo responsable de grandes cifras de mortalidad infantil (Bern y cols., 1992; Black y cols., 1980; Gomes y cols., 1991; Huilan y cols., 1991) y de gastos de millones de dólares en hospitalizaciones de infantes con menos de seis meses (Ardern-Holmes y cols., 1999; Cook y cols., 1990). Además ocasiona pérdidas económicas por la infección de especies animales de importancia ganadera tales como cerdos, vacunos y aves (Kapikian y Chanock, 1996; Kapikian, 1996). A pesar de haberse aprobado recientemente el uso masivo en humanos de una vacuna tetravalente (Joensuu y cols., 1998), persisten dudas de la eficacia de ella, pues serotipos virales no cubiertos por la vacuna serían de mayor importancia epidemiológica en algunos países (Bishop, 1999).

### 2.- Estructura.

El virión infectivo de Rotavirus consiste en 11 segmentos de RNA de doble hebra protegidos por tres cubiertas proteicas. Cada uno de los segmentos del genoma codifica un polipéptido viral, siendo seis de ellos estructurales y cinco no estructurales. El tamaño de los segmentos varía entre 650 y 3300 pares de bases de RNA y todos ellos tienen una estructura de "cap" en el extremo 5' de la hebra codificante. La geometría de la partícula infectiva es icosaédrica y tiene un diámetro de 70 nm (fig. 1).



**Figura 1. Principales características de la cepa prototipo SA11.**

A la izquierda se muestra la resolución por electroforesis de los segmentos del RNA genómico viral de SA11. La columna que indica peso molecular de proteínas codificadas, se refiere a peso molecular aparente calculado en SDS-PAGE. La figura de la derecha fue tomada de Prasad y cols. (1988).

Estudios de la estructura de la partícula por medio de crio-microscopía electrónica de alta resolución (Prasad y cols., 1996) han evidenciado que el genoma tiene una organización estructural y está en contacto con dos enzimas del virus: VP1 y VP3. VP1 es la RNA polimerasa RNA dependiente (Valenzuela y col., 1991) que efectúa los procesos de transcripción y replicación del genoma. VP3 posee actividad guanilil transferasa (Pizarro y col., 1991) y sintetiza el cap del mensajero de cada uno de los segmentos.

La cubierta proteica interna está compuesta de 60 dímeros de VP2, proteína que funciona como el esqueleto o soporte del llamado "core" viral (VP1+VP2+VP3+genoma). Más externamente, se encuentra la cubierta intermedia compuesta de 260 trímeros de VP6. La subpartícula que consta de core y VP6 es denominada partícula de doble cubierta (Clapp y Patton, 1991).

Por último, la partícula infectiva (o de triple cubierta) cuenta con 780 moléculas de la glicoproteína VP7 y 120 unidades de VP4 (la "espícula" del virión; Estes, 1996). Tanto VP4 como VP7, por ser las proteínas externas, son las más importantes desde el punto de vista de la inmunogenicidad del virus.

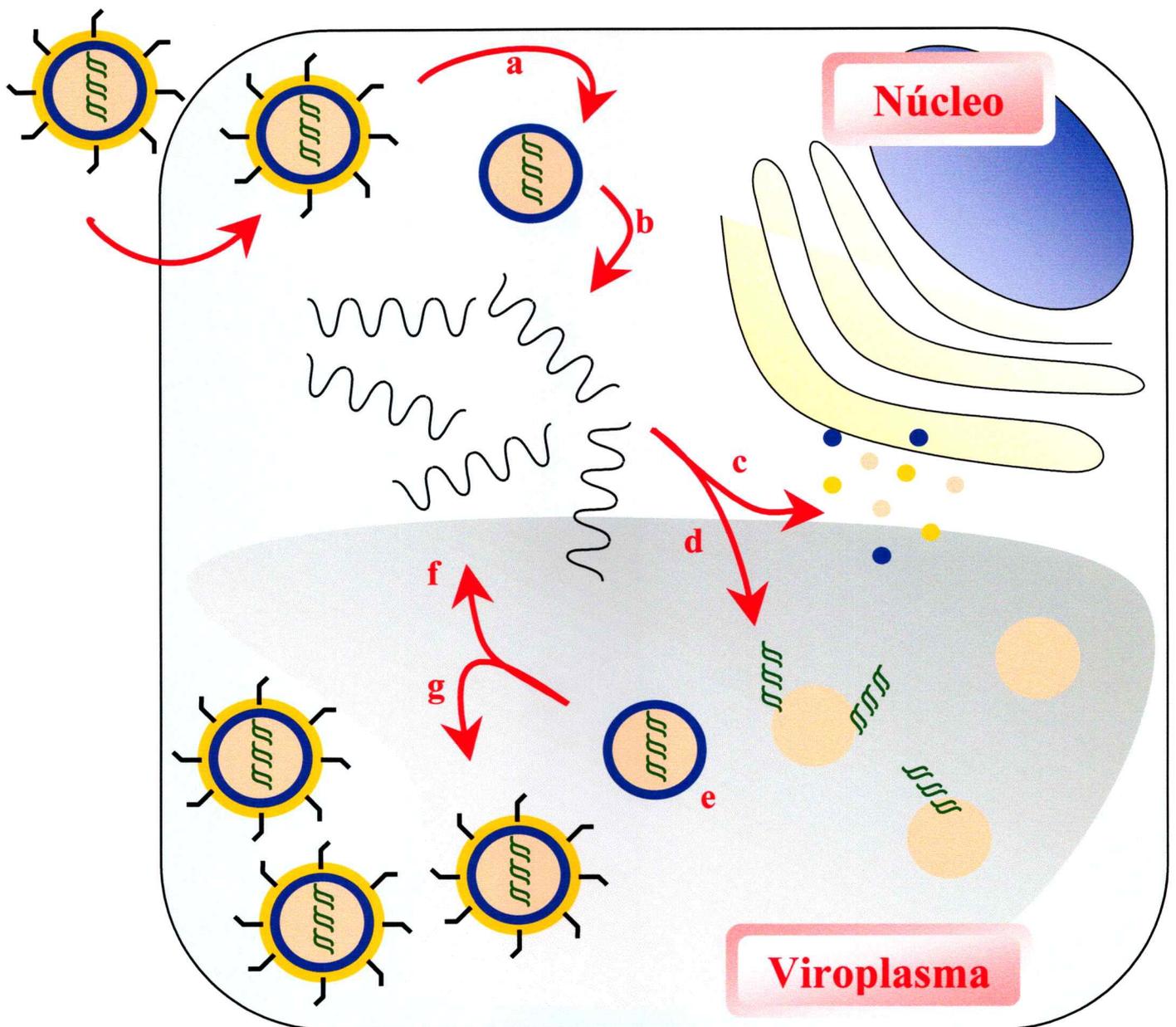
### **3.- Ciclo infectivo.**

Aún no se ha podido identificar con plena exactitud el receptor celular que sirve de anclaje para Rotavirus en los tejidos epiteliales del duodeno (Ciarlet y Estes, 1999), habiéndose sugerido un papel relevante a glicolípidos y glicoproteínas que contienen moléculas de ácido siálico (Fukudome y cols, 1989; Srnka y cols., 1992). El proceso de internalización del virus aparentemente no involucra la formación de una vacuola como

es característico para otros virus sin membrana (Kaljot y cols., 1988). El ciclo infectivo de Rotavirus se desarrolla totalmente a nivel citoplasmático, por lo que cuenta con su propia maquinaria enzimática para transcripción y replicación de su genoma.

Una vez en el citosol, la partícula pierde su cubierta externa (VP7+VP4; fig. 2a) y se ha podido demostrar que es la partícula de doble cubierta la que realiza el proceso de transcripción (fig. 2b; Helmberger-Jones y Patton, 1986). Este proceso ha sido estudiado *in vitro* y es utilizado para la obtención de mRNA viral en grandes cantidades. VP6, proteína que conforma la cubierta intermedia, cumpliría un papel importante en la externalización de los mensajeros del interior de la partícula pues *in vitro* el core no realiza transcripción (Sandino, 1990). En un primer momento del ciclo infectivo, el RNA mensajero viral es direccionado a los ribosomas para la síntesis de polipéptidos virales (fig 2c). Si bien los mensajeros virales poseen una estructura "cap" en el extremo 5', no son poliadenilados. Algunos estudios sugieren que una de las proteínas no estructurales del virus mediaría en la traducción a través de la interacción con los factores de iniciación, supliendo de esta manera la ausencia del extremo poly(A) (Piron y cols., 1998).

En una siguiente etapa, contando con proteínas estructurales, se da inicio a la morfogénesis. Los mensajeros son utilizados como templado para la síntesis del RNA genómico de doble hebra (fig 2d), proceso que ocurre en compartimientos llamados viroplasmos y aparentemente envolvería la acción de la polimerasa viral (VP1) conjuntamente con VP2 proporcionando el andamiaje estructural. Uno de los grandes misterios en el estudio de la morfogénesis de Rotavirus es el proceso de ordenamiento



**Figura 2.** Principales eventos durante el ciclo infeccioso de Rotavirus.

Una vez ocurrida la entrada del virus a la célula, se indican en el esquema: a) la pérdida de la capa externa. b) el proceso de transcripción. c) la producción de polipéptidos virales. d) la síntesis de RNA genómico. e) la producción de nuevas partículas de doble capa, capaces de f) efectuar transcripción nuevamente o de g) producción de partículas maduras.

de los segmentos del genoma viral, pues se ha demostrado que la proporción de partículas defectivas es muy baja, teniendo que existir por lo tanto un proceso de reconocimiento de los segmentos para poder empaquetar una copia de cada gen en cada nueva partícula. Al parecer, en los procesos de regulación de la replicación y de ordenamiento tendrían una función importante las proteínas no estructurales (Estes, 1996).

Una vez formadas subpartículas de tipo "core", en el viroplasma es adicionada la cubierta intermedia (VP6; fig. 2e) del virión. Se presume que estas nuevas subpartículas de doble cubierta también podrían ser capaces de efectuar transcripción para aumentar así la disponibilidad de mensajeros (fig. 2f). Finalmente, las subpartículas de doble cubierta son transportadas al retículo endoplasmático, donde son internalizadas por la acción receptora de NSP4. Al interior del retículo endoplasmático es adicionada la última cubierta de VP7 y VP4 (fig. 2g) generándose así partículas maduras. Aunque el virión no presenta membrana lipídica, se ha observado que durante este último paso de la morfogénesis aparece un intermediario membranoso (Soler y cols., 1982). Acorde con esta hipótesis, se ha encontrado a VP7 en las membranas del retículo a tiempos previos al acúmulo de partículas maduras (Poruchynsky y Atkinson, 1991). Finalmente, la salida de las partículas maduras de la célula ocurre por la lisis de ésta.

#### **4.- Aspectos Patogénicos e Inmunológicos.**

A nivel molecular se ha observado que la infección por Rotavirus afecta la homeostasis celular alterando las concentraciones de iones como potasio, sodio y principalmente calcio. Particularmente se ha visto que NSP4 es capaz de mediar la

liberación de calcio del retículo endoplasmático (Tian y cols., 1996; ), factor que podría ser determinante en la patogénesis (Ball y cols., 1996; Pérez y cols., 1998). También la virulencia está determinada por algunas de las características de la espícula (VP4). Ésta puede o no ser sensible a la activación por tripsina y a su vez determina el rango de huésped (Burke y Desselberger, 1996).

Por otro lado, Xu y cols. (1998) pudieron verificar que la infección por Rotavirus modifica el patrón de expresión de proteínas de la célula hospedera, habiéndose identificado dos proteínas cuya expresión es aumentada considerablemente. Dado el carácter citoplasmático del ciclo infectivo, resta por dilucidar el mecanismo por el cual la infección afecta la expresión génica celular.

La típica variabilidad de virus RNA ha sido observada en Rotavirus, habiéndose encontrado una riqueza antigénica importante en las proteínas estructurales. Se ha estandarizado una clasificación antigénica en función de las dos proteínas de la cubierta externa: VP7, de la cual se han encontrado más de 14 variaciones (tipos G, por glicoproteína) y VP4, conociéndose más de 20 tipos P (por proteasa-sensitiva). Diversos tipos G y tipos P han sido encontrados en Rotavirus humanos (Kapikian y Chanock, 1996).

### **5.- Variabilidad Genética.**

Además de la variación intrínseca debida a los errores cometidos por la RNA polimerasa RNA dependiente (estimada en por lo menos  $5 \times 10^{-5}$  mutaciones/pb por Blackhall y cols., 1996), hay dos fenómenos que dan cuenta de la variabilidad en el

genoma de Rotavirus: el rearrreglo de segmentos individuales y el reordenamiento de segmentos entre dos cepas distintas.

Los rearrreglos consisten en duplicaciones parciales en la secuencia de un segmento determinado. En la mayor parte de los casos el fenómeno no afecta al marco de lectura del segmento, ubicando la duplicación en la región no traducida del extremo 3'. Este fenómeno sólo ha sido observado en los segmentos 5, 6, 7, 10 y 11 de Rotavirus de diversas especies (Desselberger, 1996). La ausencia de rearrreglos en otros segmentos ha sugerido que el origen del fenómeno sea en gran medida dependiente de secuencias. Además es importante considerar que ninguno de los rearrreglos descritos ha significado un aumento de más del 5% del tamaño total del genoma viral, lo que podría dificultar el empaquetamiento del genoma al interior de la partícula. Kojima y cols. (1996), al analizar secuencias repetidas de un fragmento 11 rearrreglado, han sugerido que la duplicación se produjo durante la síntesis de la hebra positiva (transcripción). Esta alternativa es bastante probable además porque durante la transcripción la hebra sintetizada es liberada del complejo transcripcional, mientras que durante la síntesis de la hebra negativa, ésta permanece unida al templado formando el dsRNA, siendo más difícil que la polimerasa "retroceda" a una región anterior.

El fenómeno de reordenamiento fue detectado al aislarse cepas de Rotavirus portadoras de segmentos provenientes de dos cepas distintas y ocurre cuando una misma célula es infectada simultáneamente por dos partículas con genomas distintos. Este proceso ha permitido el estudio de genes individuales (genética clásica) reordenando genes específicos en fondos genéticos conocidos (Chen y cols., 1989). Los mejores

ejemplos de aplicación de esta tecnología han sido la creación de la vacuna tetravalente (reordenamiento del segmento 9 de origen humano en fondo genético de una cepa proveniente de simio) y el mapeo de mutaciones termosensibles (Ramig, 1997). El valor de esta técnica es aún mayor considerando que todavía no ha sido posible establecer un sistema de genética reversa para Rotavirus para poder hacer mutagénesis dirigida y posterior re-empaquetamiento de mutantes artificiales.

El patrón de migración electroforética de cada uno de los segmentos de RNA genómico se ve afectado por los fenómenos antes descritos, por lo que se ha establecido una clasificación en función de los genotipos de Rotavirus que complementa las clasificaciones antigénicas.

#### **6.- Proteínas no estructurales.**

Utilizando el modelo de infección en cultivos celulares, se ha podido definir algunos de los procesos que ocurren durante el ciclo infectivo del virus. Sin embargo, esto no ha bastado para elucidar el papel exacto que cumplen cada una de las proteínas no estructurales, siendo la excepción NSP4, a la cual ya se le han atribuido dos funciones importantes como son servir de receptor en el retículo endoplasmático (Au y cols., 1993) y posiblemente un rol toxigénico en la patogénesis viral (Ball y cols, 1996).

Se ha podido detectar, principalmente a través de geles de retardo, afinidad por RNA en varias de las proteínas no estructurales. NSP1 contiene dos dedos de zinc a los que se les ha mapeado la afinidad específica por los extremos 5' de los mRNA virales. Asimismo, NSP3 tiene afinidad específica por el extremo 3' de los mensajeros virales. Esta afinidad específica de NSP1 y NSP3 acoplado al hecho de una fuerte asociación de

estas proteínas al citoesqueleto celular ha sugerido un posible papel en direccionar los mensajeros hacia los centros-de traducción (Patton, 1995). Por otro lado, NSP2 tiene afinidad inespecífica por RNA y se ha demostrado que esta afinidad depende de la multimerización de la proteína (Kattoura y col., 1992).

Por medio de diversos enfoques se ha tratado de estudiar las interacciones de varios de los polipéptidos virales. Así, por medio de fraccionamiento celular de monocapas infectadas se ha podido identificar subpartículas virales de diversa complejidad que incluyen algunas de las proteínas no estructurales. Patton y Gallegos (1988) identificaron una subpartícula con actividad replicasa (síntesis de RNA genómico) que además de VP1 y VP2 incluía NSP2 y NSP3. En gradientes de sacarosa Maass y Atkinson (1990) encontraron un heterolímero conformado por VP7, VP4 y NSP4, determinando la importancia de esta última proteína en el proceso de reclutamiento de la subpartícula de doble cubierta hacia el retículo endoplasmático para su maduración final (Meyer y cols., 1989).

Por otro lado, a través de inmunoprecipitación con anticuerpos específicos para una proteína viral se ha detectado la co-precipitación de otros polipéptidos. Con esta metodología se confirmó la interacción de NSP2 con VP1 y VP2 en un complejo con actividad replicasa (Aponte y col., 1996). Finalmente, con la metodología de doble híbrido en levadura, se han sugerido interacciones entre NSP1/NSP2, NSP1/NSP3 y NSP1/NSP5 (González y col., 1998). Sin embargo, estos estudios han sido muy poco concluyentes, pues el nivel de interacción observado es bastante débil al compararlo con controles positivos de interacción. Varias de estas posibles interacciones están

respaldadas por estudios previos donde se han encontrado estructuras complejas a nivel viroplasmático que incluyen a varios de estos polipéptidos no estructurales (Gallegos y Patton, 1989).

La única interacción con proteínas celulares bien establecida es la de NSP3 con el factor de inicio de traducción eIF-4G1. Esta interacción ha permitido especular que NSP3 secuestra al factor de iniciación de traducción, impidiendo su interacción con la proteína asociada al poli(A) (PABP), disminuyendo de esta forma la traducción de los mensajeros poliadenilados, es decir, de origen celular (Piron y cols., 1998).

#### **7.- NSP5.**

Conocida en la nomenclatura antigua como NS26, tiene un peso molecular previsto por secuencia de alrededor de 21 KDa. y un peso aparente en electroforesis de 26 KDa. Este mayor peso aparente está dado por las modificaciones post-traduccionales de las que es objeto: fosforilaciones diversas (Welch y cols., 1989) y O-glicosilación (González y Burrone, 1991). Estas modificaciones han llevado a especular (Patton, 1995) un posible papel regulatorio, típico de otros ejemplos de fosfoproteínas virales (Yeh y cols., 1996; Barik y cols., 1995; Barber y cols., 1998), aunque tal regulación no ha podido ser demostrada aún.

La secuencia aminoacídica de NSP5 muestra un altísimo contenido de residuos de serina. Blackhall y cols. (1997) demostraron que las fosforilaciones ocurren principalmente en estos residuos, sin poder estimar exactamente los residuos fosforilados. El análisis de secuencias consenso (Hoffmann, 1999) en NSP5 de la cepa

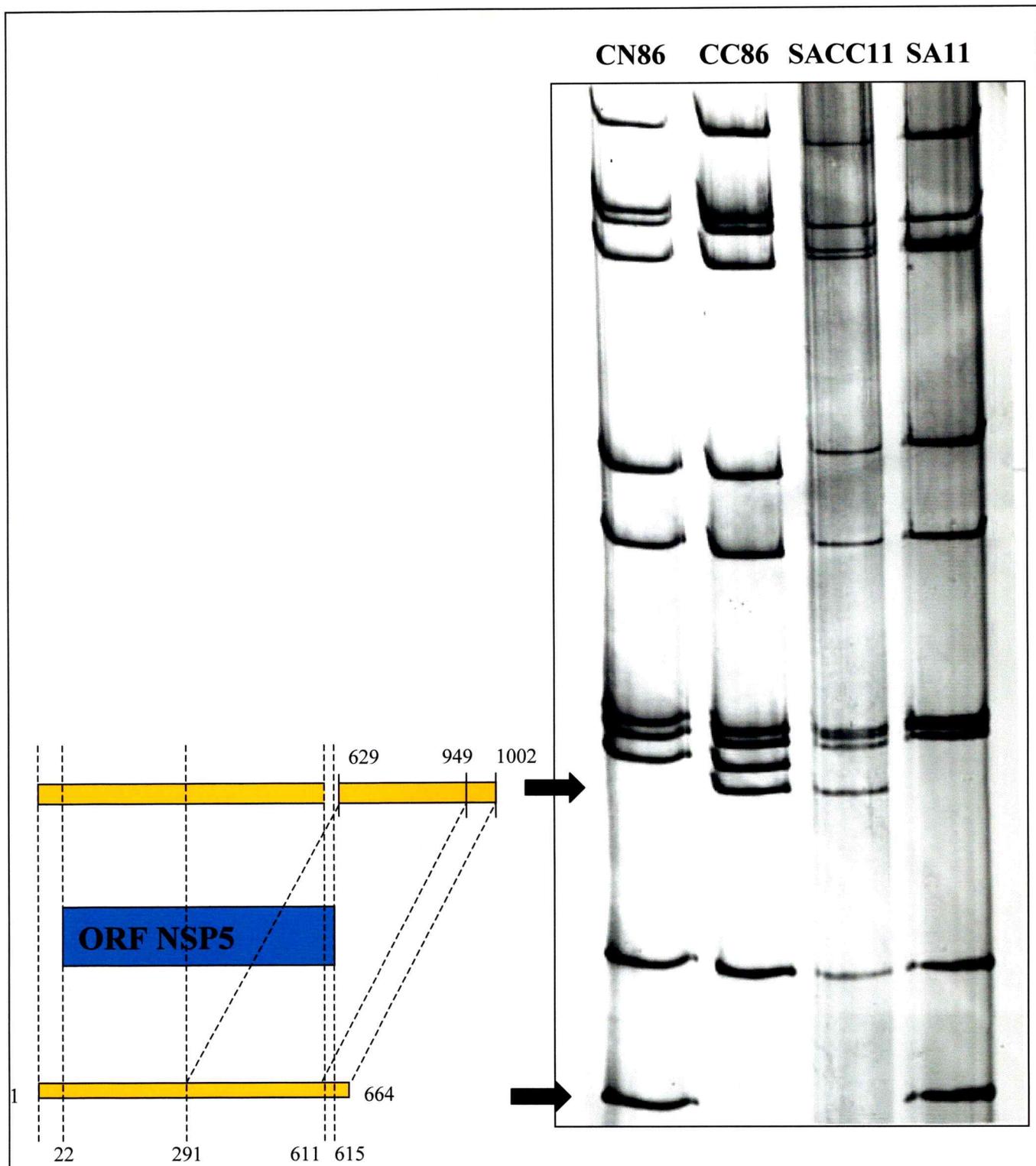
prototipo SA11 mostró la existencia de diversos sitios potencialmente fosforilables tanto por quinasa CK2 como quinasas de tipo PKC.

Tal como había sido sugerido por Mattion y cols. (1994), se pudo establecer una actividad auto-quinasa de NSP5 (Afrikanova y cols., 1996; Blackhall y cols., 1997; Poncet y cols., 1997). En estos estudios se utilizó NSP5 recombinante (expresada en bacteria) o proteína obtenida en sistemas no celulares de expresión. Al incubar la proteína en presencia de ATP radiactivo, se recuperó la proteína marcada. Además, la interacción con NSP2 potenciaría la actividad auto-quinasa, sea por mejoramiento de la capacidad enzimática o mejor disposición de los residuos sustrato (Afrikanova y cols., 1998). Se presume que sea una enzima quinasa atípica, pues no cuenta con las secuencias características de enzimas de este tipo.

Poncet y cols. (1997) han sugerido una correlación entre el grado de fosforilación y la localización en viroplasmos de NSP5. En esta misma línea, recientemente Fabbretti y cols. (1999) mostraron que la co-expresión de NSP2 y NSP5 forman estructuras semejantes a viroplasmos en células eucariontes. Esto tiende a confirmar el modelo propuesto por Patton (1995) en el cual estas dos proteínas dirigirían a los mensajeros virales hacia el viroplasma en donde ocurriría la síntesis de la hebra negativa del genoma.

### **8.- Antecedentes del presente trabajo.**

Mattion y cols. (1990) caracterizaron por primera vez las cepas de Rotavirus porcino CN86 y CC86, aisladas de una misma muestra fecal de lechón. La diferencia evidente entre ellas era un rearrreglo en el segmento 11 de CC86, visualizado en



**Figura 3. Rearreglo genético del segmento 11.**

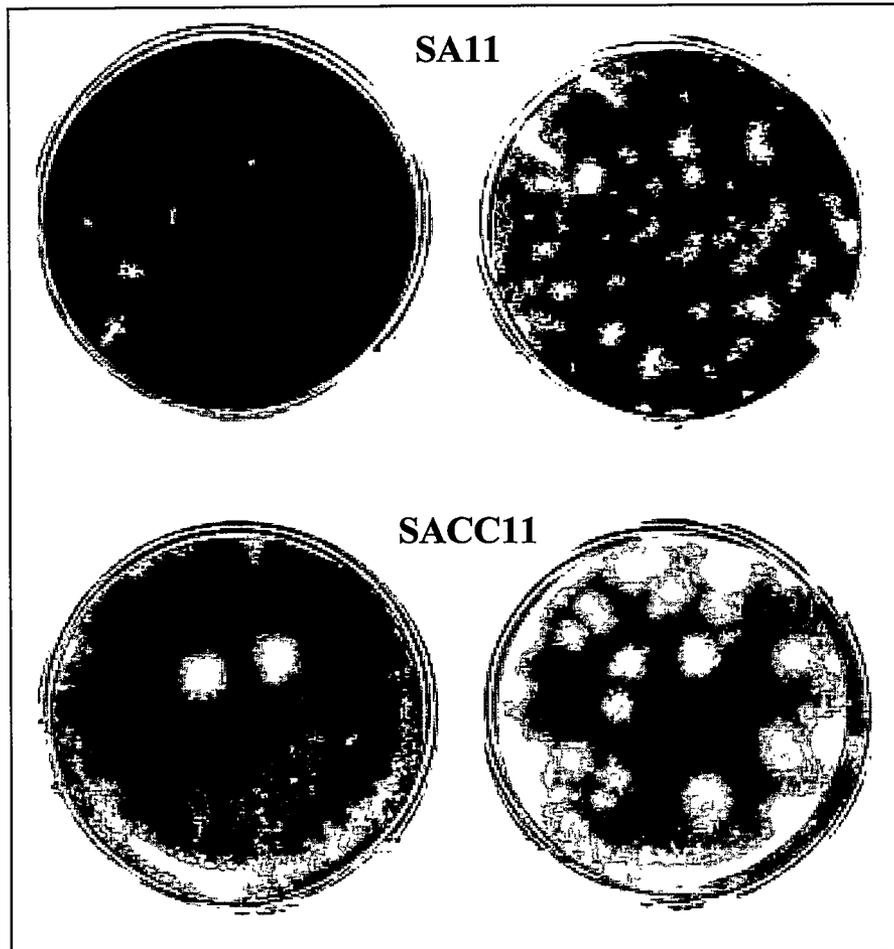
A la izquierda se esquematiza la duplicación del segmento 11 de CC86. A la derecha se muestra el RNA genómico de las cuatro cepas mencionadas separados en electroforesis.

electroforesis de RNA (fig. 3). Por otro lado, se encontró el fenotipo denominado “placa grande” al comparar la cepa CC86 con CN86. Además, ensayos de co-infección entre ambas cepas mostraron que sistemáticamente la cepa CC86 sobrecrecía a CN86, lo que sugería una ventaja selectiva. Se buscaron causas de orden molecular para explicar los fenómenos, sin haber podido explicar la relación entre rearreglo, placa grande y sobrecrecimiento.

Inmediatamente se planteó la hipótesis de una relación causa/efecto: el segmento rearreglado de CC86 promovía el fenotipo de placa grande. La prueba genética definitiva de una correlación la efectuó Fernández (1996) al crear por reordenamiento una nueva cepa portadora del gen rearreglado de CC86. Esta nueva cepa, SACC11, tiene un fondo genético idéntico al de la cepa prototipo SA11 (substitución del fragmento 11 por la de origen porcino, fig. 3). La característica más importante, por cierto, es que mantuvo el fenotipo de placa grande al compararla a su parental (fig. 4).

Las secuencias de los fragmentos 11 de CN86 y de CC86 mostraron diferencias reflejadas en el marco de lectura. Las proteínas codificadas por cada cepa tenían cuatro aminoácidos distintos. A pesar de la identidad observada (98%), surgen dudas sobre el origen del fenotipo placa grande: se debe al rearreglo o a las diferencias de NSP5?

Dado que con la cepa SACC11 se aisló por primera vez un fenotipo natural propagable a la progenie, se planteó la posibilidad de explicar las causas de dicho fenotipo. Cómo un segmento rearreglado o una proteína (NSP5) podían modificar el ciclo infeccioso de tal manera que –en el modelo de cultivo celular– otorgara una gran ventaja como lo sugiere una placa grande?



**Figura 4. Ensayos de placas de lisis de las cepas estudiadas.**

La cepa portadora del segmento 11 heterólogo (SACC11, parte inferior) produce placas de lisis de mayor tamaño que su parental SA11 (parte superior).

Analizados estos antecedentes se determinó como objetivos de esta tesis.

- i) Analizar molecularmente características de la cepa SAC11 que podrían estar promoviendo el fenotipo de placa grande y de sobrecrecimiento: síntesis de ácidos nucleicos, proteínas y subpartículas virales.
- ii) Comparar las dos variantes de la proteína NSP5 en términos de características bioquímicas tales como actividad auto-quinasa, susceptibilidad a fosfatasas, migración electroforética.
- iii) A partir de las diferencias entre las dos cepas, atribuir un papel a NSP5 en el contexto del ciclo infeccioso de Rotavirus.

## MATERIALES

### 1.- Reactivos.

<sup>35</sup> S-Metionina:	NEN Labeling mix, NEG072 (Act. esp. >1000Ci/mmol).
<sup>32</sup> P-Ortofosfato	NEN, NEX053C (8500 Ci/mmol).
Bz- $\alpha$ -Gal-NAc	SIGMA (B4894)
H-7	SIGMA (I6891).
Ácido Okadaico	Life Technologies (13166-012).

### 2.- Soluciones.

Buffer de Lisis:	10 mM Tris pH 7,5 ; 50 mM NaCl ; 1% Tritón X-100
Buffer RIPA	50 mM Tris pH 8,0 ; 125 mM NaCl ; 30 mM KCl ; 1% Tritón X-100 ; 1% Deoxicolato de sodio ; 0,1% SDS ; 20 mM EDTA.
Solución de Chomczynski	4M Tiocianato de guanidino ; 25 mM citrato de sodio pH 7,0 ; 0,5% Sarcosyl.
Solución TRIZOL	20 mL Sol Chomczynski ; 144 $\mu$ L $\beta$ -Mercaptoetanol ; 20 mL Fenol ácido (saturado en agua) ; 2 mL Acetato de Sodio (2M, pH 4,0).
Buffer fosfatasa	50 mM Tris pH 7,5; 1 mM DTT; 1 mM MnCl <sub>2</sub> .
Buffer kinasa	50 mM Tris pH 8,5; 20 mM MgCl <sub>2</sub> .

### 3.- Partidores.

Sp1      ggc ttt<sup>^</sup> taa agc gct aca gtg a  
Sp2      ggt cac aaa acg gga gtg g  
Sp3      cca ctc acc agc ttt tcg att ag  
E904     acg cgg atc ctc tct cag cat tga cgt  
E905     aaa act gca gtt ata aat ctt cga tca att gc  
E960     aaa gct ggt gag tgg atc gtt tga ag  
E983     tat tcc gga tta ttc ata cc  
E984     ctg att atg atc ctc tag ta  
E985     cgg ata aca att tca cac ag  
E986     gtt ctg agg tca tta ctg g  
E987     gtt ttc cca gtc acg ac  
E988     ttc aca cag gaa aca gc

### 4.- Otros.

Los anticuerpos monoclonales anti-NSP5 158G37 y 162D26 fueron donados por el Dr. Jean Cohen del INRA, Jouy-en-Josas, Francia. La cepa SA11 de Rotavirus fue donada por el Dr. John Patton del NIH, Bethesda, USA. La cepa reordenante SAcc11 fue generada por el Dr. Jorge Fernández en nuestro laboratorio. La cepa M15[pREP4] de *E. coli* y el plasmidio pQE30 para expresión de proteínas fueron obtenidos de QIAGEN Inc.

## MÉTODOS

### 1.- Cultivo celular.

#### 1.1.- Células MA-104.

Para el crecimiento de la línea celular MA-104, derivada de fibroblastos de riñón de mono verde, se sembraron aproximadamente  $30 \times 10^3$  células por  $\text{cm}^2$  de superficie y se mantuvieron en medio mínimo de EAGLE (MEM) en presencia de 5% de suero fetal bovino (SFB) por 18 horas. Cuando se indica, el medio fue substituido por MEM sin suero.

#### 1.2.- Células Sf-9.

La línea celular de *Spodoptera frugiperda*, Sf-9, fue cultivada en medio GRACE suplementado y en presencia de 10% de SFB, sembrándose alrededor de  $100 \times 10^3$  células por  $\text{cm}^2$  de superficie en cada pasaje. Cuando se indica, se reemplazó el medio por GRACE sin suplemento ni SFB.

#### 1.3.- *Escherichia coli*.

Para la manipulación de bacterias se siguieron los procedimientos estándar descritos en Maniatis y col. (1982).

### 2.- Infección y propagación de cepas virales.

#### 2.1.- Rotavirus.

Previo a su infección, las cepas de rotavirus fueron activadas por tratamiento con Tripsina a una concentración final de 10  $\mu\text{g/ml}$  durante 30 minutos a 37°C.

Posteriormente, el inóculo fue diluido en MEM hasta alcanzar la multiplicidad de infección (M.O.I.) deseada, medida en u.f.p./cél. (unidades formadoras de placa por célula). Este inóculo fue sembrado en monocapas confluentes de células MA-104, previamente lavadas con PBS. Después de una hora de adsorción con agitación leve cada diez minutos, el inóculo fue removido y las monocapas mantenidas en MEM sin suero. Los tiempos denominados "horas post-infección" se comienzan a contar desde el final del período de adsorción.

En algunos ensayos se adicionaron al medio los siguientes compuestos: H-7, inhibidor de kinasas de tipo PKC, a 50  $\mu$ M final; Bz- $\alpha$ -GalNAc, inhibidor de O-glicosilación, a 2 mM final.

Cuando se indica, el proceso de infección fue detenido, por congelamiento o lisis. Para propagación, utilizando M.O.I. de 5 u.f.p./cél., se esperó hasta observar un efecto citopático en más del 80% de las células (24 horas).

## **2.2.- Baculovirus.**

Las cepas recombinantes de baculovirus fueron propagadas por infección de monocapas confluentes de células Sf-9, previo dilución del inóculo en medio GRACE sin suplemento. El inóculo fue mantenido en contacto con las células por períodos de 2 a 4 horas para posterior reemplazo por medio GRACE suplementado y con 10% de SFB. El efecto citopático demoró entre 6 y 8 días.

### **3.- Marcación de cultivos con radioisótopos.**

Para el análisis de proteínas virales, el medio de monocapas infectadas fue substituido por MEM deficiente en metionina, 1 hora antes del pulso de  $^{35}\text{S}$ -Metionina (50  $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ ). Para analizar proteínas fosforiladas, así como ácidos nucleicos virales, se utilizó medio deficiente en fosfato 1 hora antes del pulso de  $^{32}\text{P}$ -ortofosfato (200  $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ ). Una vez transcurrido el tiempo de pulso, las monocapas celulares fueron lavadas con PBS y congeladas. Para el análisis, a las monocapas congeladas se les adicionó buffer de lisis, manteniéndose 1 hora en hielo y posterior retiro del debris celular por centrifugación a 2000 x g durante 10 minutos a 4°C.

### **4.- Análisis de macromoléculas.**

Para el análisis del RNA genómico viral, los lisados fueron sometidos a extracción fenólica y posterior precipitación con etanol durante 18 horas. Por centrifugación a 20000 x g durante 30 minutos a 4°C se obtuvo el RNA genómico de doble hebra (dsRNA). El genoma fue resuspendido en buffer de carga para posterior análisis en gel de poliacrilamida al 7%. En el caso de lisados marcados, el gel fue secado y sometido a autoradiografía. En el caso de lisados fríos, el gel fue sometido a tinción con plata específica para ácidos nucleicos (Herring y col., 1982).

Las proteínas fueron analizadas directamente en geles de poliacrilamida al 14% (Laemmli, 1970) para posterior análisis por autoradiografía o tinción por plata específica para proteínas.

Para el análisis de subpartículas virales fue seguido el protocolo de Gallegos y Patton, 1989. Los lisados marcados fueron mezclados con una solución de carga no denaturante y separados en geles de agarosa al 0,6% en Tris-Glicina (50mM, pH 8,8). Posteriormente, el gel fue secado y sometido a autoradiografía.

El mRNA viral fue analizado por medio de Northern Blot con una sonda específica para el extremo 5' del segmento 11 de las cepas SA11 y SAcc11. Esta sonda fue obtenida por PCR utilizando los partidores Sp1 y E960 con posterior marcaje por Random Primer (Life Technologies). La extracción de RNA total se hizo lisando directamente las monocapas en solución TRIZOL, agitación 5 minutos y rescate de sobrenadante por centrifugación (20000 x g, 5 min, 4°C); los RNA mensajeros fueron precipitados 16 horas a -20°C con 1 volumen de isopropanol y posterior centrifugación (20000 x g, 5 min, 4°C); se resuspendieron en solución Chomczynsky (con 0,72% de  $\beta$ -mercaptoetanol) y nuevamente precipitados 16 horas con 1 volumen de isopropanol; después de la centrifugación, los RNA mensajeros fueron lavados una vez con etanol 75% y secados para resuspensión en buffer de carga para electroforesis denaturante.

## **5.- Expresión de NSP5. (Figura 5)**

### **5.1.- Clonamiento de las variantes de NSP5.**

Tanto de la cepa SA11 como de la cepa SACC11 se hicieron extracciones preparativas de RNA genómico. Para aislar el gen 11, se resolvieron los segmentos en PAGE y después de tinción con bromuro de etidio, se cortaron los segmentos de gel correspondientes. La acrilamida se mantuvo 48 horas en buffer de elución (0,5 M

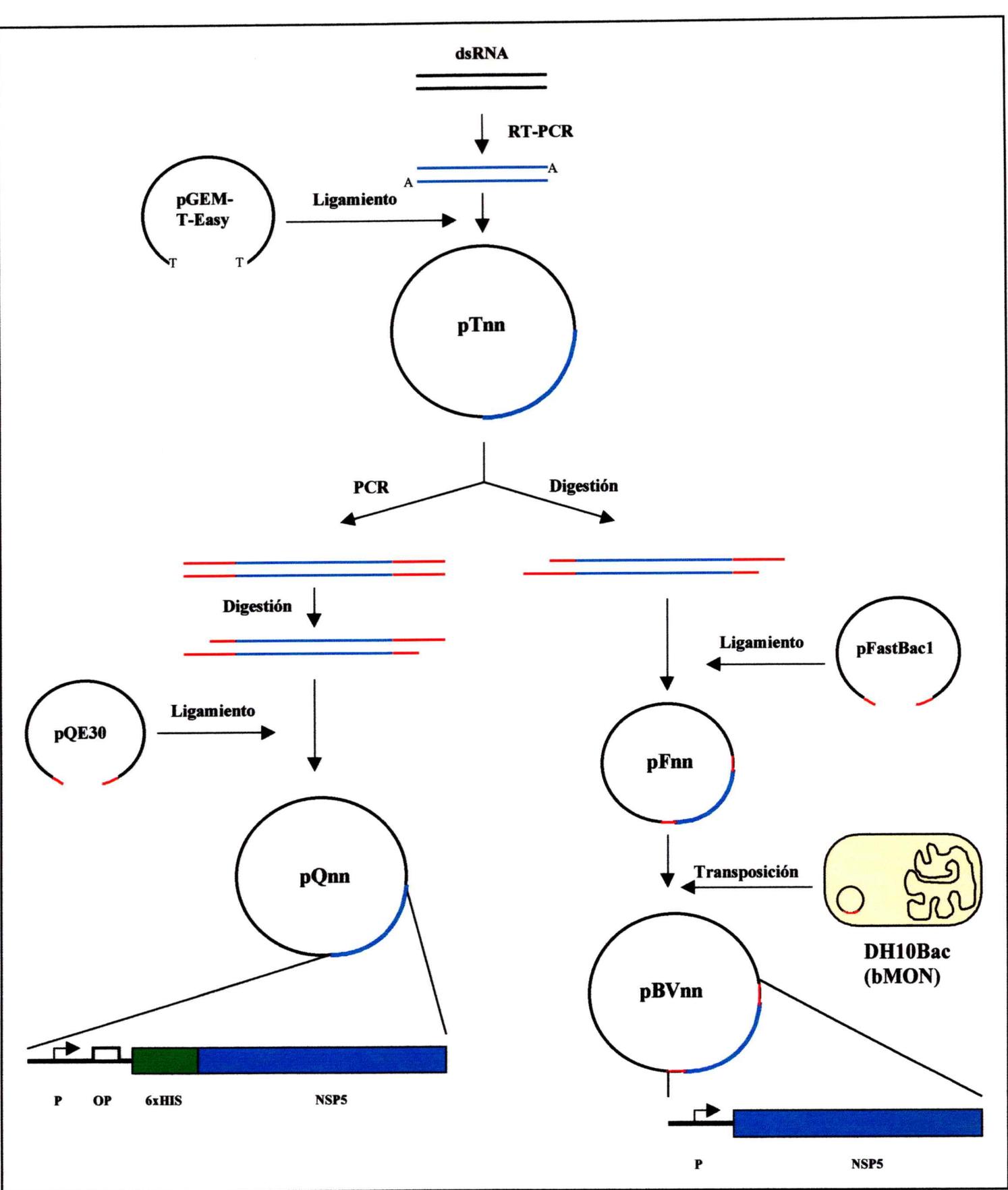


Figura 5. Diagrama de clonamientos y subclonamientos para la expresión de NSP5.

Acetato de amonio, 10 mM Acetato de magnesio, 1 mM EDTA [pH 8,0], 0,1% SDS). Posteriormente, el dsRNA presente en el sobrenadante fue precipitado con etanol por 18 horas y lavado con etanol 75%.

Cada segmento fue sometido a un ensayo de RT-PCR usando los partidores Sp1 y Sp2. Inicialmente, la mezcla de RNA y partidores fue denaturada por 6 minutos a 100°C, siendo transferida a hielo. La síntesis de cDNA se efectuó usando MMLV-RT (100 U), 0,75 mM MgCl<sub>2</sub>, RNasin (PROMEGA, 5 U) en un volumen final de 20 µL durante 30 minutos a 42°C. La transcriptasa reversa fue inactivada a 100°C por 10 minutos. La amplificación se efectuó con la misma mezcla de cDNA con concentración final de 2 mM de MgCl<sub>2</sub> y con 2,5 U de Taq polimerasa. Se realizaron 35 ciclos de denaturación a 94°C (1,5 min.), hibridación a 57°C (2 min.) y extensión a 72°C (2 min.). Se finalizó con una extensión a 72°C por 10 minutos.

Para la obtención de amplicones puros, las muestras de PCR fueron resueltas en geles de agarosa de bajo punto de fusión y las bandas específicas cortadas para extracción fenólica y precipitación con etanol. Estos fragmentos fueron ligados al vector pGEM-T-Easy (PROMEGA) según indicaciones del fabricante en un volumen final de 10 µL. De esta mezcla, 1 µL fue utilizada para la electroporación de células electrocompetentes (*E. coli*, JM109) para posterior selección en placas de medio LB en presencia de ampicilina (100 µg/mL).

Para el análisis de clones obtenidos, se repicaron las colonias blancas en 20 µL de agua. Esta suspensión de bacterias fue lisada por hervor durante 10 minutos y

centrifugada a 2000 x g por 1 minuto. De este lisado se usó 1  $\mu$ L para un nuevo round de PCR con el fin de detectar las colonias portadoras del segmento de interés.

### **5.2.- Subclonamiento y expresión en bacterias.**

Utilizando plasmidios obtenidos de los clonamientos en pGEM-T-Easy antes descritos, se efectuaron ensayos de PCR con polimerasa de alta fidelidad utilizando los partidores E904 y E905 cuyos extremos tienen sitios de restricción para BamHI y PstI respectivamente. Estos partidores fueron diseñados para que después de la doble digestión, se pudiera ligar el inserto al vector pQE30 (QIAGEN) también doblemente digerido obteniéndose así un clonamiento en fase con el marco de lectura del vector. Esta estrategia permitió fusionar al extremo N-terminal de cada variante de NSP5 una secuencia de 6 residuos de histidina para posterior purificación por afinidad. Los insertos ligados al vector fueron electroporados como antes descritos en células M15[pREP4] y seleccionados con ampicilina (100  $\mu$ g/mL) y kanamicina (25  $\mu$ g/mL).

Las proteínas de fusión HIS-NSP5 fueron expresadas por crecimiento de los clones hasta una O.D.<sub>600</sub> de 0,6 y posterior adición del inductor de expresión (IPTG). El cultivo se mantuvo durante 4 horas en agitación cuando las células fueron cosechadas por centrifugación a 6000 x g durante 20 minutos a 4°C y congeladas para su posterior uso.

### **5.3.- Subclonamiento y expresión en baculovirus.**

Para la expresión en baculovirus se utilizó el sistema Bac-to-bac (Life Technologies) que se basa en el uso de un vector intermediario en bacteria y posterior

transposición al vector definitivo. De los plasmidios obtenidos como se describe en el ítem 5.1., se hicieron digestiones con PstI/SphI ó NotI. El segmento purificado fue desfosforilado y ligado al vector pFastBac1 (Life Technologies). Se electroporaron células de la cepa DH10Bac y se plaquearon en presencia de Kanamicina (50 µg/mL), Gentamicina (7 µg/mL) y Tetraciclina (10 µg/mL). Para seleccionar los clones en los que hubiera ocurrido el proceso de transposición del inserto al vector bMON, se analizaron las colonias blancas por PCR (como ya descrito) utilizando los partidores de secuenciamiento del bMON.

De los clones positivos se hicieron preparaciones de DNA plasmidial y posteriormente transfecciones de células Sf-9 utilizando liposoma Cellfectin (Life Technologies). Después de una semana, cada transfección fue repasada a una nueva monocapa de células Sf-9 para probar la expresión. Al quinto día post-repase, las células fueron cosechadas, lisadas y analizadas por Western blot para detectar la expresión de las proteínas recombinantes.

#### **6.- Secuenciamientos y análisis.**

Para el secuenciamiento directo del genoma viral, se hicieron preparaciones de dsRNA según especificado en el ítem 5.1. Posteriormente se amplificó con reacción de RT-PCR usando los partidores Sp1 y Sp2, correspondientes a los extremos del segmento 11. La reacción de secuencia se efectuó usando el kit fmol (PROMEGA) con los mismos partidores de la amplificación además del partidor Sp3 (equivalente a las bases 229-251 del segmento 11). La lectura se hizo en geles denaturantes de poliacrilamida con posterior secado y autoradiografía.

Las secuencias de DNA plasmidial obtenidos de los clonamientos y de DNA de baculovirus se hicieron por electroforesis capilar en secuenciador automático ABI-PRISM 310 después de la reacción indicada por el fabricante. Los partidores para secuenciar clones derivados de pGEM-T fueron E987 y E988; para clones derivados de pQE30, E985 y E986; para clones de baculovirus, E983 y E984.

Los alineamientos de secuencias se hicieron utilizando el programa PCGENE 2.0. Para el análisis de sitios de fosforilación en las secuencias de proteínas, se utilizó el PROSITE Database Program (<http://www.expasy.ch/sprot/prosite.html> ; Hoffmann y cols., 1999). Para la búsqueda de potenciales sitios de O-glicosilación se usó el sistema O-GLYCBASE 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/databases/OGLYCBASE> ; Gupta y cols., 1999)

## **7.- Inmunofluorescencia.**

Monocapas de células MA104 cultivadas en pocillos provistos de placas de 10 mm fueron infectadas con Rotavirus. A las 6 horas post-infección, las células fueron lavadas con PBS, fijadas y permeabilizadas con metanol. Posteriormente fueron incubadas durante 1 hora con anticuerpo anti-NSP5 diluido 1:1000 en PBS. Después de cuatro lavados con PBS, se incubaron con anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a fluoresceína. Después de abundante lavado con PBS, las placas fueron sumergidas 5 segundos en bromuro de etidio (0,5 µg/mL) y nuevamente lavadas. Inmediatamente se procedió a la visualización en microscopio de fluorescencia y fotografiadas. Para efectos de comparación paralelamente se ensayó la detección de VP6 con anticuerpo monoclonal específico.

## **8.- Ensayos con NSP5 *in vitro*.**

### **8.1.- Purificación de NSP5 expresada en *E. coli*.**

Las proteínas de fusión recombinantes (6xHIS-NSP5) fueron purificadas en mini-columnas de afinidad de níquel N<sub>I</sub>NTA (QIAGEN) en condiciones no denaturantes, según especificaciones del fabricante. Después de la adsorción del lisado bacteriano durante 16 horas con agitación leve, la columna fue empaquetada. Se efectuó un lavado en presencia de 50 mM de imidazol y se hicieron eluciones a 100 mM, 150 mM y 250 mM del mismo.

### **8.2.- Inmunoprecipitación.**

Se utilizaron lisados de células MA104 infectadas, de células Sf-9 post-expresión o de *E. coli* con expresión inducida. Se adicionó un volumen de buffer RIPA y de 1 a 5  $\mu$ L de anticuerpo a-NSP5 (158G37 o 162D26) y se incubó en hielo durante una hora. Posteriormente se agregaron de 10 a 50  $\mu$ L de una suspensión al 50% de Sepharosa / Proteína A. Se mantuvo en agitación suave durante 16 horas. Finalmente se efectuaron lavados con agitación y centrifugación (2000 x g, 3 min, 4°C) 2 veces con buffer RIPA y dos veces con 50 mM Tris pH 7,5.

### **8.3.- Modificaciones *in vitro*.**

Para remover grupos fosfato de las proteínas se siguió el protocolo de Blackhall y cols. (1997): se incubaron inmunoprecipitaciones de proteínas marcadas a 37°C por 60 minutos en buffer fosfatasa con 0,5 U de Proteína Fosfatasa 2A (PROMEGA).

Los ensayos de actividad kinasa de NSP5 se efectuaron como indicado por Poncet y cols. (1997) inmunoprecipitaciones frías o 6xHIS-NSP5 recombinantes fueron incubadas en buffer kinasa con 0,7 MBq de [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP durante 2 horas a 37°C.

#### **9.- Análisis cuantitativo de radioemisiones.**

Todo el material marcado con radioisótopos fue analizado por electroforesis. Previo a la autoradiografía, los geles fueron secados sobre papel filtro y sometidos al análisis en un radio-escáner PhosphoImager BIORAD GS-525. Como resultado se obtuvieron patrones de radioactividad del gel que fueron posteriormente analizados con el programa Molecular Analyst (BIORAD). Esto permitió la cuantificación precisa de la radiactividad en cada banda del gel. Las medidas se obtienen en unidades arbitrarias del equipo, proporcionales a la emisión.

Para el análisis, cada banda cuantificada fue corregida contra el background. Cuando fue posible, la comparación entre carriles se hizo previo a la normalización respecto a una banda constante en el gel.

## RESULTADOS

### 1.- SA11 vs. SACC11: comparaciones iniciales.

#### 1.1.- Secuenciamiento y análisis del segmento 11 reordenado en SACC11.

Una vez obtenida la cepa reordenante SACC11, cuya única diferencia con la parental SA11 es el segmento 11, se procedió a secuenciar directamente este segmento. Usando partidores de los extremos y un partidor interno, se pudo verificar que durante el reordenamiento el segmento 11 no había sufrido mutaciones, confirmándose la secuencia de la cepa CC86 descrita por Blackhall y cols. (1997; EMBL X80537).

Al comparar la secuencia aminoacídica deducida de NSP5 de las cepas SA11 (Welch y cols, 1989; Genbank M28347), SACC11 (idéntica a la de CC86) y CN86 (EMBL X80538) se observaron 4 diferencias entre SACC11 y CN86 y 14 diferencias entre SACC11 y SA11 (figura 6). En la tabla 1 se detallan las diferencias en la predicción de modificaciones post-traduccionales hechas por los programas PROSITE y O-GLYCBASE para cada variante de la proteína. Además de las secuencias consenso de PKC y de CK2, se calcularon posibles fosforilaciones en cascada por CK2, pues el requerimiento de esta enzima es un residuo ácido en la posición +3 después de una serina/treonina; este residuo ácido puede ser otro residuo antes fosforilado (Roach, 1991).

Las diferencias previstas incluyen 2 sitios de O-glicosilación en el extremo amino-terminal en el caso de SA11 que no están en CN86 ni CC86, pero éstas tendrían

CC86/SACC11	MSLSIDVTSLSISSSIFKNESS	<b>ST</b>	TSTL	<b>SGK</b>	SIGRSEQYISPDAEAFNK	50						
CN86	MSLSIDVTSLSISSSIFKNESS	<b>ST</b>	TSTL	<b>SGK</b>	SIGRSEQYISPDAEAFNK	50						
SA11	MSLSIDVTSLSIPS	<b>S</b>	TIYKNESS	<b>ST</b>	TSTL	<b>SGK</b>	SIGRSEQYISPDAEAFNK	50				
	*****	*	.	*	*****	*****	*****					
CC86/SACC11	YMLSK	<b>SPED</b>	IGPS	<b>S</b>	SDSASNDPLTSF	<b>SIR</b>	SNAVK	<b>TNAD</b>	AGVSMDSST	<b>T</b>	QSRPS	100
CN86	YMLSK	<b>SPED</b>	IGPS	<b>S</b>	SDSASNDPLTSF	<b>SIR</b>	SNAVK	<b>TNAD</b>	AGVSMDSST	<b>T</b>	QSRPS	100
SA11	YMLSK	<b>SPED</b>	IGPS	<b>S</b>	SDSASNDPLTSF	<b>SIR</b>	SNAVK	<b>TNAD</b>	AGVSMDSST	<b>A</b>	QSRPS	100
	*****	*****	*	*****	*****	*****	*****	*****	*****	.	*****	
CC86/SACC11	SNVGCQVDFSLTKGINVNANLDSCISISTD	HKKEK	<b>SKK-DK</b>	<b>SRK</b>	HYPRI	149						
CN86	SNVGCQVDFSLTKGVNVSANLDSCISISTD	YKKEK	<b>SKK-DK</b>	<b>NRK</b>	HYPRI	149						
SA11	SNVGCQVDFSLNKGLKVKANLDSSISISTD	<b>TKKE</b>	KSKQNHK	<b>SRK</b>	HYPRI	150						
	*****	**	.	*	*****	*****	*****	.	*	*****		
CC86/SACC11	EAD	<b>SDSE</b>	DYVLDD	<b>SDSD</b>	DGKCKNCKYKKKYFALRMRMKQVAMQLIEDL	197						
CN86	EAD	<b>SDSE</b>	DYVLDD	<b>SDSD</b>	DGKCKNCKYKKKYFALRMRMKQVAMQLIEDL	197						
SA11	EAE	<b>SDSD</b>	DYVLDD	<b>SDSD</b>	DGKCKNCKYKKKYFALRMRMKQVAMQLIEDL	198						
	**	.	***	*****	*****	*****						

**Figura 6. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas deducidas de las variantes de NSP5.**

Los residuos resaltados en amarillos y con doble tachado (**S** y **T**), indican posibles sitios de O-glicosilación. Los sitios enfatizados en celeste e itálico (por ej. **TKK** ó **SPED**), indican posibles fosforilaciones de serina y treonina (por PKC ó CK2). Los sitios subrayados indican posibles fosforilaciones secundarias por CK2. Los símbolos debajo de las secuencias indican: asterisco (\*), consenso absoluto; punto (.), aminoácidos de un mismo grupo; espacio, sin consenso.

**Tabla 1. Modificaciones post-traduccionales esperadas en cada variante de NSP5.**

Se describen O-glicosilaciones (O-GLY), fosforilaciones por PKC, por CK2, además de posibles fosforilaciones en cascada por CK2 (CK2\*, donde S\* y T\* representan residuos de serina o treonina fosforilados). Se indican los residuos de modificación y su número en la secuencia.

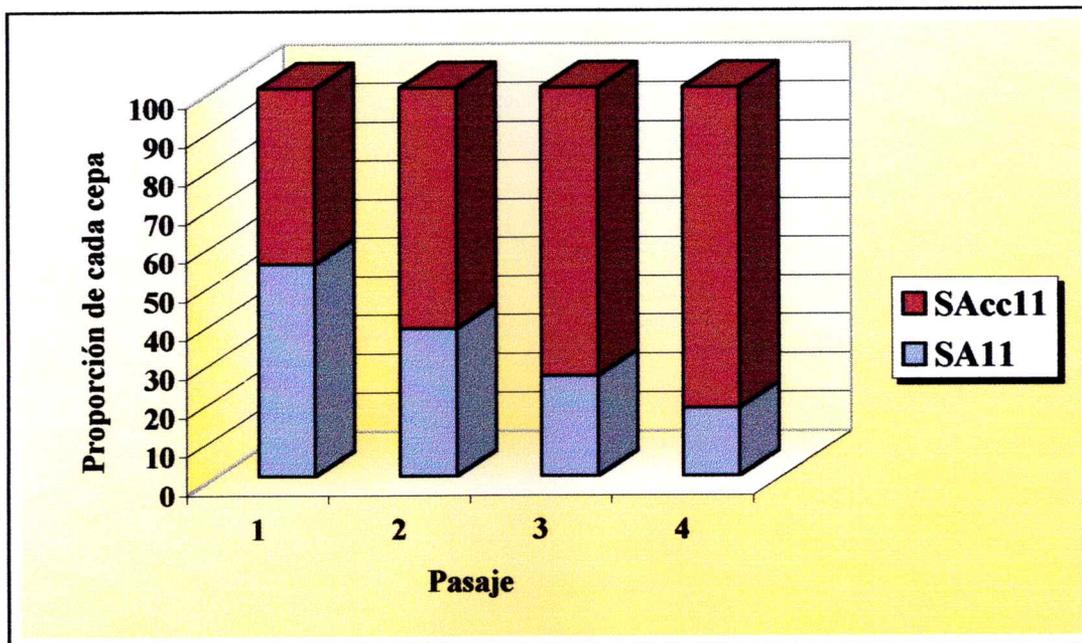
		CEPAS		
		SACC11/CC86	CN86	SA11
<b>MODIFICACIONES</b>	<b>O-GLY</b>	S - 024 T - 025 S - 063 T - 095	S - 024 T - 025 S - 063 T - 095	T - 008 S - 015 S - 024 T - 025 S - 063
	<b>PKC</b> (S/T x R/K)	SGK - 030 SIR - 075  SKK - 137 SRK - 142	SGK - 030 SIR - 075  SKK - 137	SGK - 030 SIR - 075 TKK - 132  SRK - 143
	<b>CK2</b> (S/T x x D/E)	SPED - 056 TNAD - 083  SKKD - 137 SDSE - 153 SDSD - 163	SPED - 056 TNAD - 083  SKKD - 137 SDSE - 153 SDSD - 163	SPED - 056 TNAD - 083 TKKE - 132  SDSD - 154 SDSD - 164
	<b>CK2*</b> (S/T x x S*/T*)	STTS* - 024 STLS* - 027 TSFS* - 072	STTS* - 024 STLS* - 027 TSFS* - 072	STTS* - 024 STLS* - 027 TSFS* - 072 STDT* - 129

un sitio de O-glicosilación en el residuo T95, ausente en SA11. Por otro lado, entre los residuos 125 y 145 se calculan diferencias tanto en número como lugar de posibles fosforilaciones.

### **1.2.- Comparación directa: eficiencia en co-infección.**

Sabiéndose que la cepa CC86 es capaz de sobrecrecer a la cepa CN86, se estudió la capacidad de la cepa reordenante SACC11 de hacer lo mismo con su parental SA11. Se partió de una relación inicial 5:1 (SA11:SACC11, medida en u.f.p.), es decir con ventaja para el parental. Con esta mezcla inicial, se infectaron células de las que se obtuvo el pasaje 1. Este pasaje fue nuevamente inoculado en monocapas hasta obtener así sucesivamente 5 pasajes. De todos los pasajes se hizo densitometría de los dos tipos de segmentos 11 presentes en la electroforesis de dsRNA genómico.

Tal como se observó entre las cepas CN86 y CC86, la cepa reordenante SACC11 es capaz de sobrecrecer al parental SA11. Esto queda comprobado en la figura 7, donde se grafican las proporciones de cada cepa (medida en función del segmento 11 de cada una de ellas) durante los pasajes de co-infección. En todos los experimentos efectuados, el segmento 11 de la cepa SA11 termina por desaparecer, confirmando así la transferencia del fenotipo de "canibalismo" (Mattion y cols., 1990) por medio del segmento 11 rearrreglado.



**Figura 7. Ensayo de co-infección entre las cepas SA11 y SACC11.**

En el primer pasaje se infectaron células con las cepas SA11 y SACC11 en relación 5:1. Posteriormente se hicieron pasajes seriados. En cada pasaje se cuantificó el RNA correspondiente al segmento 11 de cada una de las cepas y se calculó la proporción respecto a la suma de ambas. Se observa una tendencia al desplazamiento de la parental SA11 por parte de SACC11.

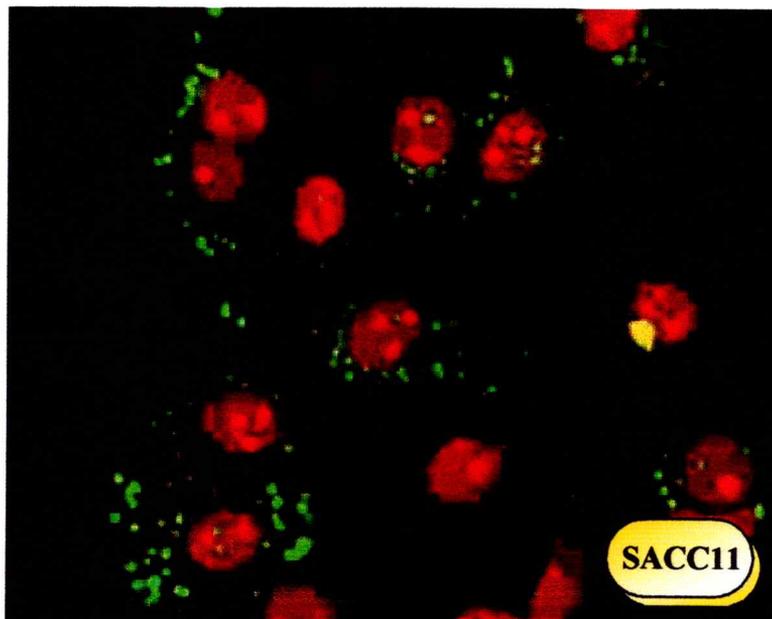
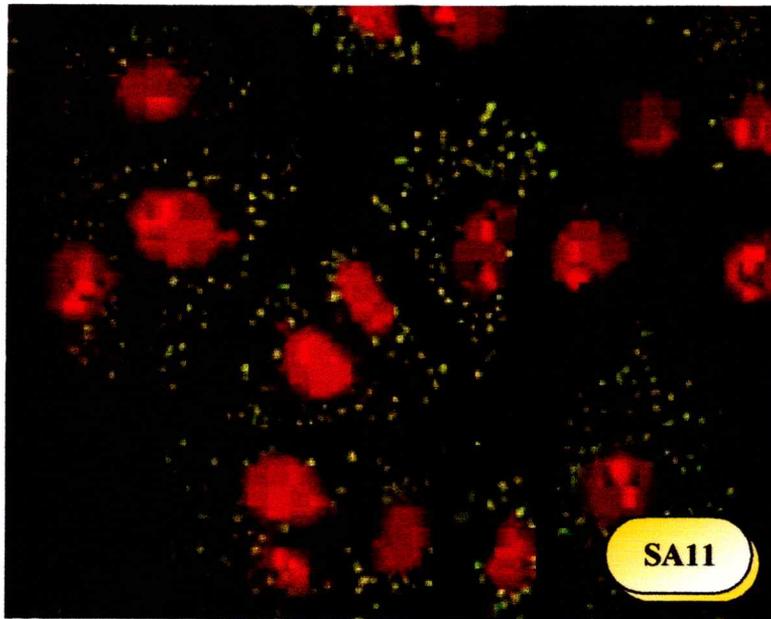
### **1.3.- Localización de NSP5 en los viroplasmias.**

Dada la premisa que NSP5 se localiza en las estructuras llamadas viroplasmias de las células infectadas, las cepas SA11 y SACC11 fueron comparadas en ensayos de inmunofluorescencia (figura 8). Monocapas después de 6 horas de infección fueron fijadas, permeabilizadas y detectadas con anticuerpo monoclonal anti-NSP5 (158G37) y anti-IgG de ratón/fluoresceína. A pesar de las diferencias en sus respectivas proteínas, no se observaron diferencias en la distribución intracelular: para ambas cepas se confirmó la agregación puntiforme característica de NSP5 (Blackhall y cols., 1998; Poncet y cols., 1997). Esta distribución contrasta con la de otras proteínas virales, como el caso de VP6 que mostró una distribución más uniforme por todo el citoplasma (datos no mostrados).

## **2.- Análisis comparativo de macromoléculas en células infectadas.**

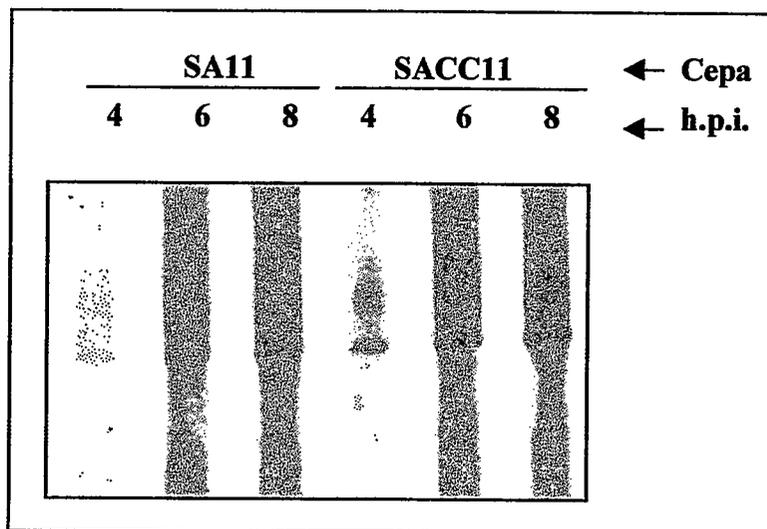
### **2.1.- Análisis de subpartículas virales.**

Buscando una explicación para el fenotipo de placas grandes, se procedió a analizar la síntesis de subpartículas a nivel citoplasmático. Monocapas infectadas con SA11 y SACC11 (MOI>5) fueron marcadas con <sup>35</sup>S-metionina a las 2 h.p.i. y cosechadas por congelamiento y lisis a 4, 6 y 8 h.p.i. Para la detección de subpartículas se utilizó el sistema de geles Tris-Glicina-Agarosa, descrito anteriormente para este fin (Gallegos y Patton, 1989). En la figura 9 se puede observar que si bien a tiempos tardíos ambas cepas acumulan cantidades semejantes de subpartículas, la cepa SACC11 logra hacerlo a tiempos más tempranos. Esto efectivamente sugiere una morfogénesis temprana de subpartículas en el caso de la cepa reordenante.



**Figura 8. Localización de NSP5 en células infectadas.**

Células infectadas con cada una de las cepas fueron fijadas y permeabilizadas a las 6 h.p.i. La proteína NSP5 fue detectada con anticuerpo específico y anti-IgG-ratón/fluoresceína. Para la visualización de los núcleos se dio un baño rápido en bromuro de etidio.



**Figura 9.** Síntesis de subpartículas virales a distintos tiempos.

En gel de Tris/Glicina/Agarosa se analizaron subpartículas del citoplasma de células infectadas con SA11 y SACC11. Se adicionó la marca de  $^{35}\text{S}$ -metionina a las 2 h.p.i. y las células fueron cosechadas a los tiempos indicados. En el caso de SACC11 a las 4 h.p.i. se observa una banda de subpartículas más intensa que la de SA11.

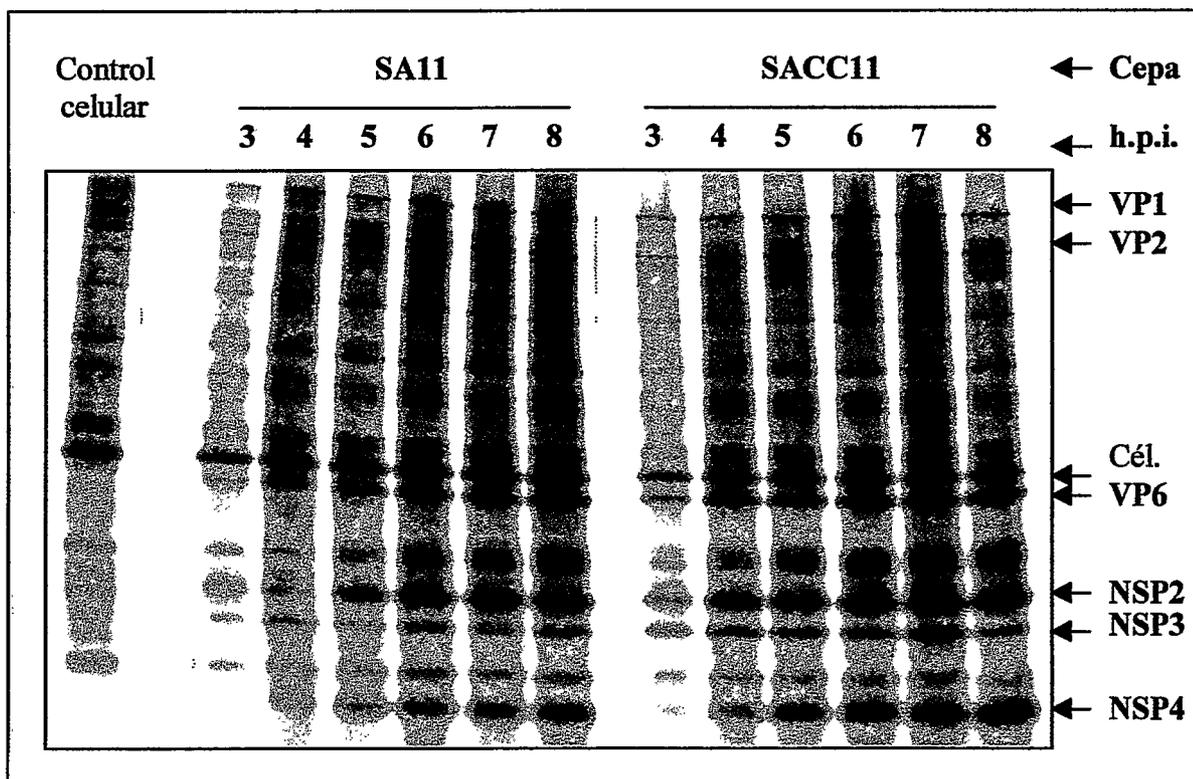
## **2.2.- Cinética de síntesis de proteínas.**

Una explicación para la formación anticipada de subpartículas podría ser un proceso de traducción de proteínas más temprano. Para verificar esta hipótesis, se marcaron proteínas con  $^{35}\text{S}$ -metionina desde las 2 h.p.i., las células fueron cosechadas a intervalos de 1 hora hasta las 8 h.p.i. y los lisados se separaron por SDS-PAGE. La autorradiografía de la figura 10 muestra que a las 3 y 4 h.p.i. la cepa SACC11 acumula mayores cantidades de polipéptidos virales que su parental SA11. Sin embargo, a tiempos más avanzados se observan cantidades semejantes de las proteínas virales.

Considerando que el fenómeno no era idéntico para todos los polipéptidos virales, se hicieron cuantificaciones de cada una de las bandas con PhosphoImager. El resultado normalizado de este análisis se muestra en la figura 11. Para cada proteína, después de corregida y normalizada respecto a una proteína celular, se estimó la razón de síntesis SACC11/SA11 a un mismo tiempo. NSP2 y VP6, a las 4 h.p.i., son mucho más abundantes en SACC11, sugiriendo que las posibles ventajas selectivas dadas por el segmento 11 rearrreglado podrían corresponder a una síntesis de proteínas virales a tiempos más tempranos.

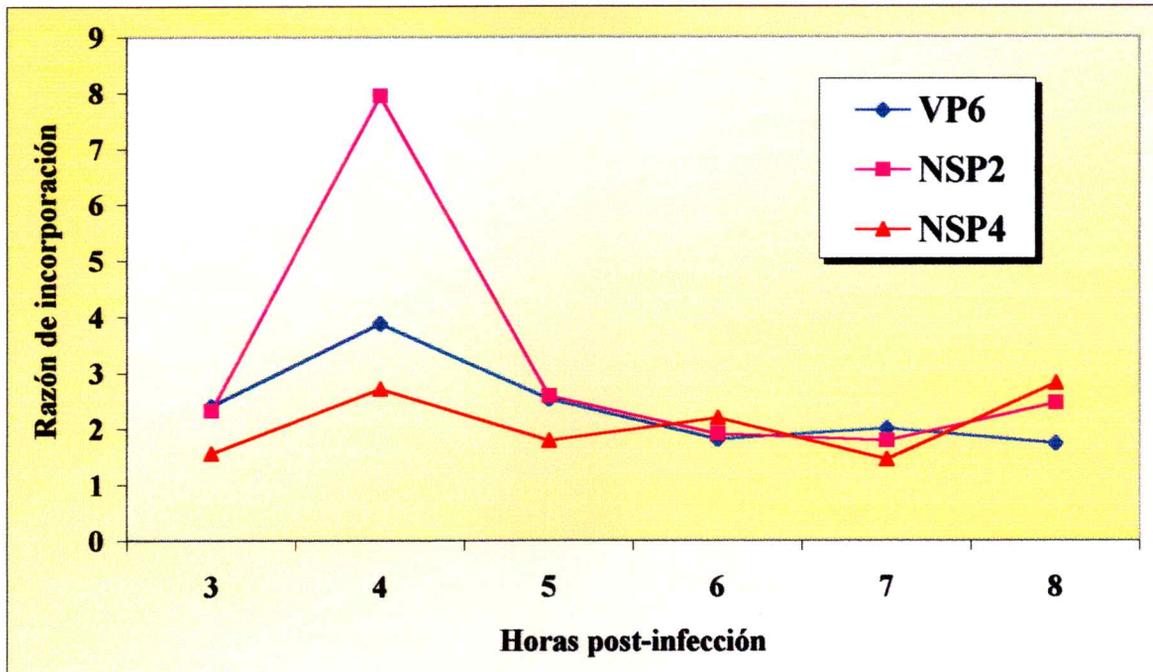
## **2.3.- RNA genómico.**

La morfogénesis de subpartículas virales implica una demanda de RNA genómico. Por esta razón, se estudió la cinética de aparición de dsRNA de cada cepa. Con este fin, se marcaron los cultivos con  $^{32}\text{P}$ -ortofosfato a partir de las 3 h.p.i. durante



**Figura 10. Cinética comparada de síntesis de proteínas.**

Monocapas infectadas fueron marcadas desde las 2 h.p.i. con  $^{35}\text{S}$ -metionina y cosechadas a los tiempos indicados. Los lisados fueron analizados en SDS-PAGE al 14% y posterior autorradiografía para detección de las proteínas sintetizadas. El carril de la izquierda es un control celular sin infectar. A la derecha se identifican los polipéptidos virales así como una proteína celular referencial.



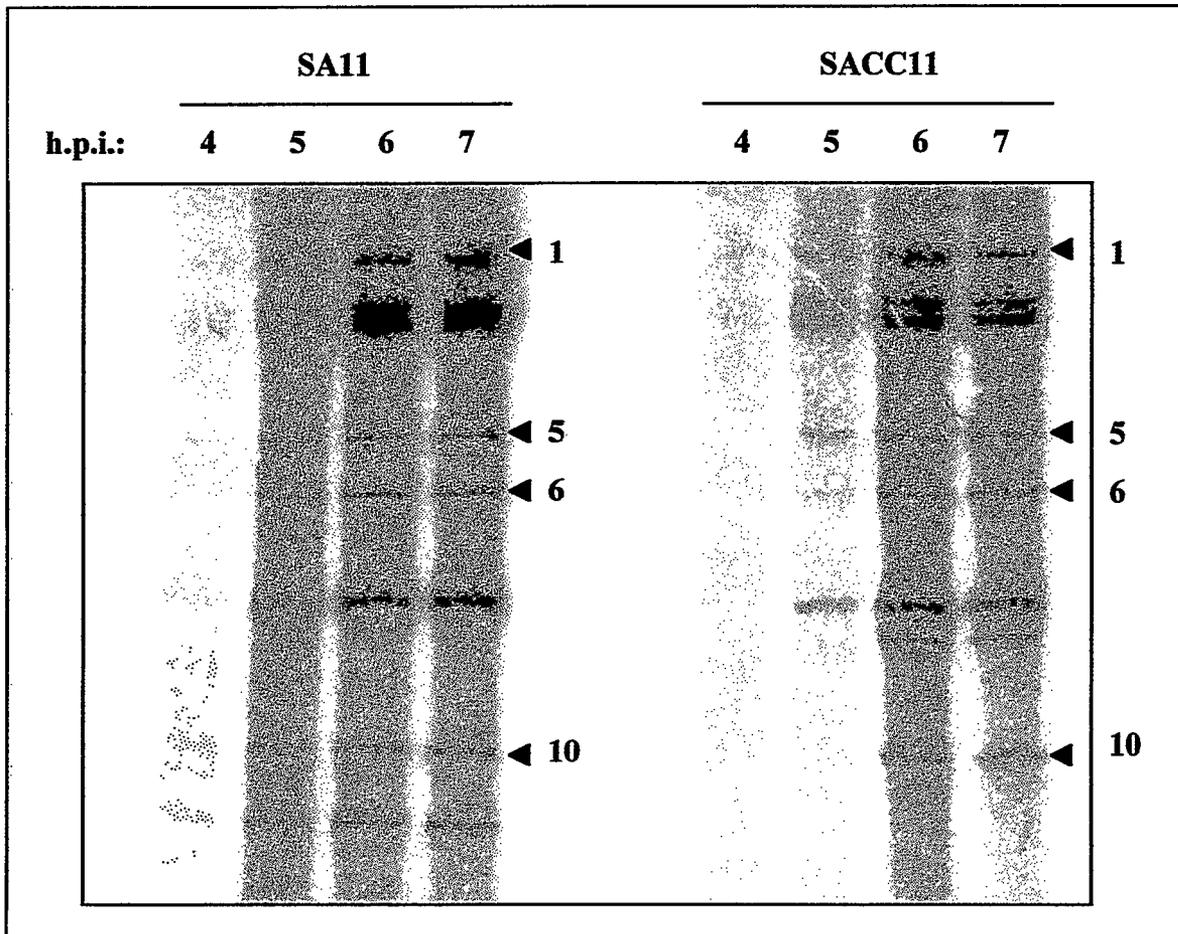
**Figura 11. Análisis cuantitativo de la síntesis proteica.**

Las bandas correspondientes a las proteínas virales mostradas en la figura 10 fueron cuantificadas, corregidas y normalizadas respecto a la proteína celular de referencia. En el eje vertical se graficó la razón SACC11/SA11 de cada proteína a un mismo tiempo post-infección. A las 4 h.p.i. SACC11 acumula una mayor cantidad de las proteínas analizadas.

distintos tiempos. Después de la lisis y la extracción fenólica de ácidos nucleicos citoplasmáticos, se analizaron en gel de poliacrilamida, como se muestra en la figura 12. No se observaron a simple vista diferencias notables en la cantidad de RNA genómico. Posteriormente, el análisis cuantitativo de los segmentos 1, 5, 6 y 10, mostró que la cepa SACC11 acumula menos RNA genómico viral que su parental SA11 (figura 13).

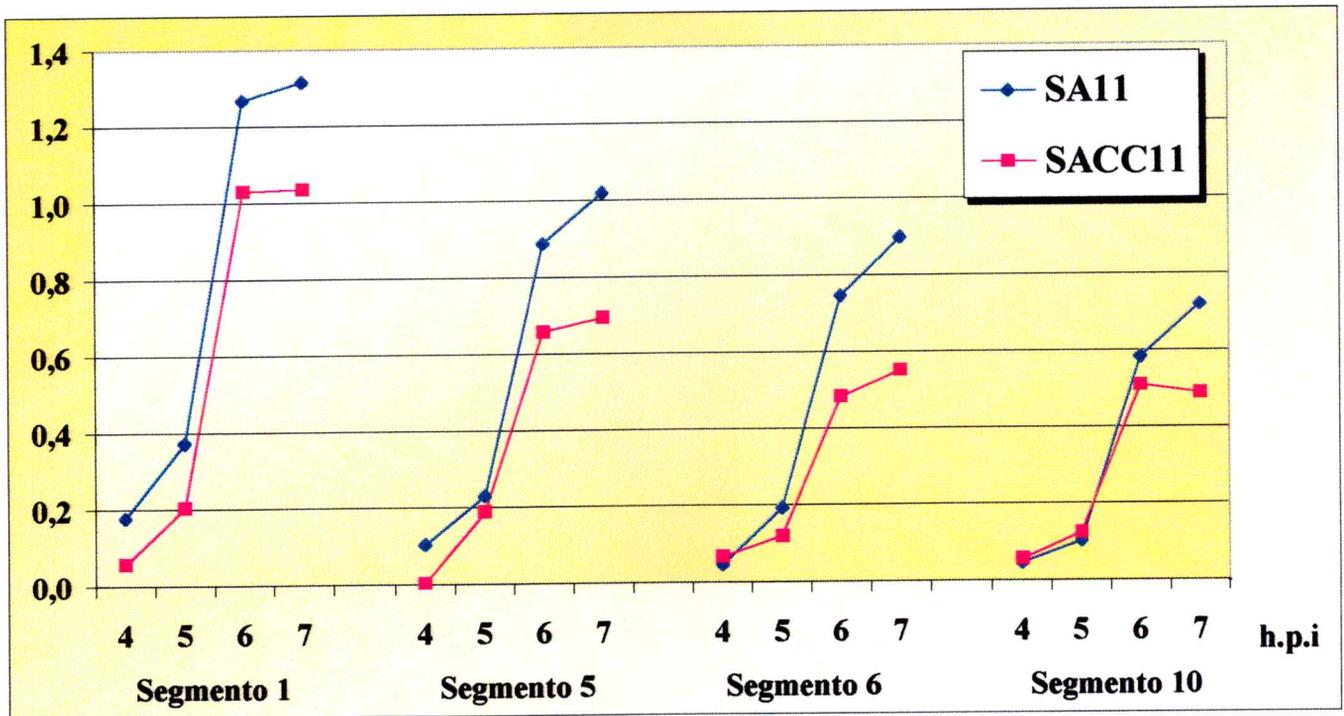
#### **2.4.- Mensajeros virales.**

En el contexto del ciclo viral (fig. 2), los mensajeros cumplen doble función: dirigen la síntesis de polipéptidos virales y además sirven como plantados para la replicación del genoma (síntesis de la hebra negativa). Considerando que a tiempos tempranos de infección la cepa SACC11 mostró más proteínas pero menos RNA genómico, se analizó la síntesis de mRNA viral. En la figura 14 se muestra el experimento de Northern blot con muestras de RNA total de células infectadas y cosechadas a distintos tiempos. La revelación se hizo con sonda específica para el segmento 11 de ambas cepas. Se confirmó la diferencia de migración en los mensajeros debida al hecho de que el segmento detectado tiene distinto tamaño en cada cepa. En ambas cepas se observa una disminución en la cantidad de mensajero entre las 3 y 5 h.p.i., hecho acorde con la cinética de aparición de RNA de doble hebra. La cepa SACC11, en los tiempos iniciales, mostró mayor cantidad de mRNA que la cepa parental, como se confirma en la figura 15 donde se grafican las emisiones de las bandas de la figura 14. Una mayor cantidad de mensajeros podría explicar la aparición de más proteínas a tiempos tempranos. Tal como visto con los polipéptidos



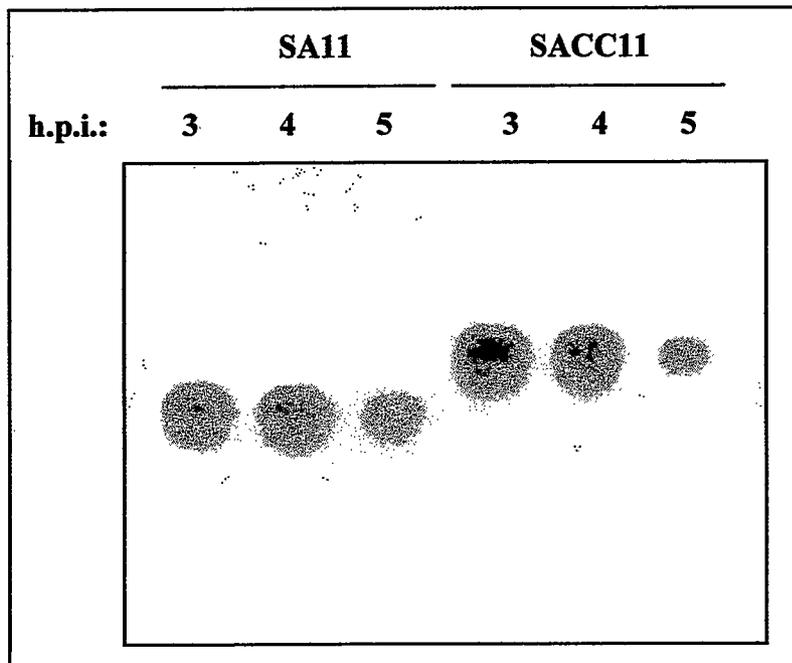
**Figura 12. Cinética de la síntesis de RNA genómico viral.**

A cultivos infectados con ambas cepas se les adicionó  $^{32}\text{P}$ -Ortofosfato a las 2 h.p.i. A los tiempos indicados se cosecharon y se extrajo el ácido nucleico presente en el citoplasma para posterior análisis por electroforesis y autorradiografía. Las flechas señalan los segmentos utilizados para cuantificar la radioactividad incorporada.



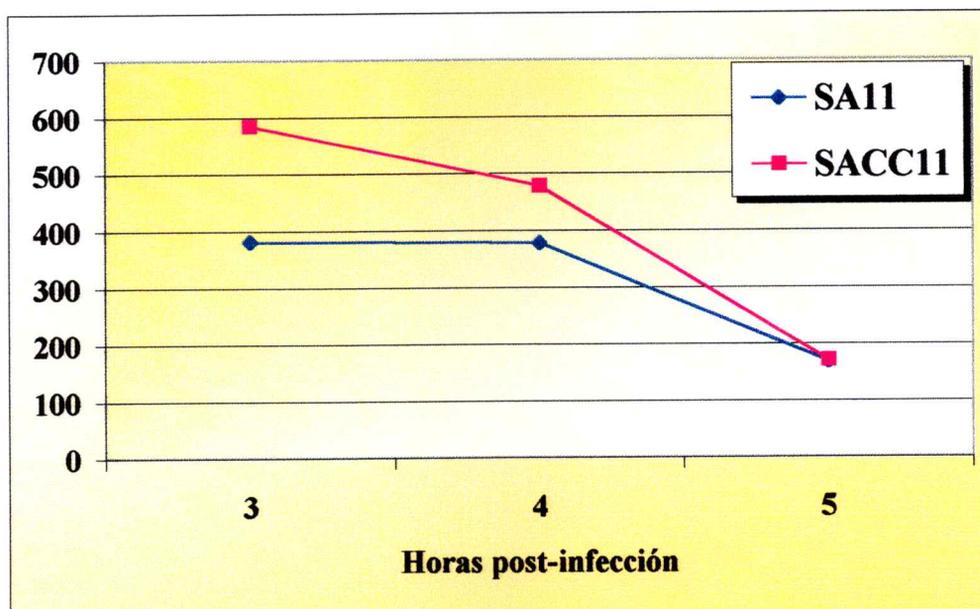
**Figura 13. Cuantificación de la síntesis de RNA genómico viral.**

De la figura 12 se cuantificaron, corrigieron y normalizaron los segmentos 1, 5, 6 y 10 del RNA genómico a los diversos tiempos post-infección. En todos los segmentos analizados, SA11 presenta mayor cantidad de RNA.



**Figura 14. Detección de mensajeros virales.**

Células infectadas fueron cosechadas a los tiempos indicados. De los lisados se extrajo el RNA total y se analizaron por Northern blot usando una sonda específica para el segmento 11.



**Figura 15.** Cuantificación de mensajeros virales.

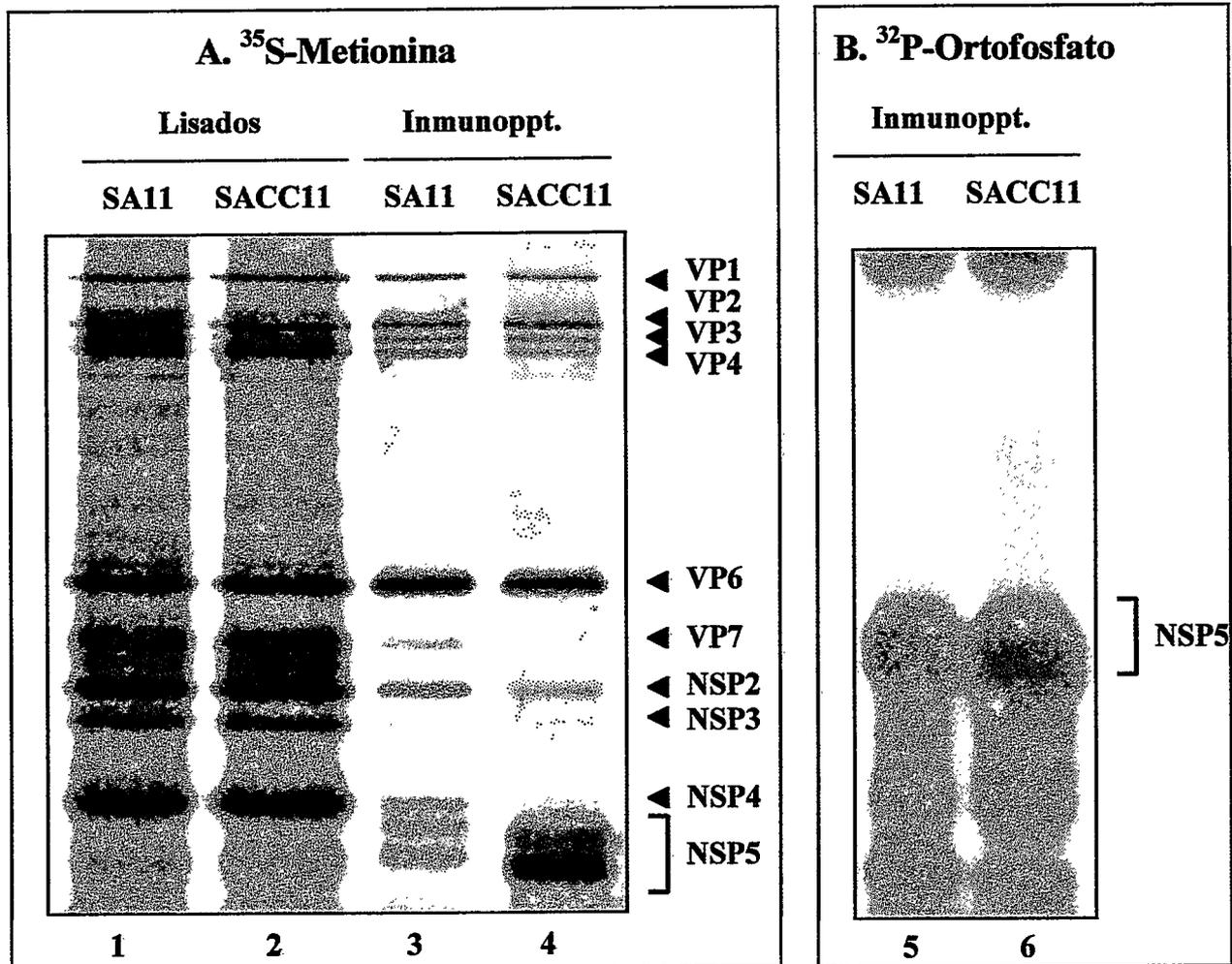
De la figura 14 se midió la intensidad de las radioemisiones (en unidades arbitrarias) de cada una de las bandas correspondientes a los RNA mensajeros del segmento 11 de cada cepa. A las 3 h.p.is. se detecta mayor cantidad de RNA mensajero en el análisis de la cepa SACC11 respecto a su parental SA11.

virales, a tiempos posteriores la cantidad de mensajeros de ambas cepas es aproximadamente igual.

### **3.- La proteína no estructural NSP5.**

#### **3.1.- Inmunoprecipitación**

Para la visualización de la proteína NSP5 se utilizó el anticuerpo monoclonal específico 158G37 en ensayos de inmunoprecipitación. El máximo de síntesis de este polipéptido ocurre a las 6 h.p.i. (Blackhall y cols., 1998), por lo que se marcaron cultivos a las 4 h.p.i. y se cosecharon a las 6 h.p.i. En la figura 16 se puede observar que partiendo de cantidades semejantes de proteínas (lisados marcados con  $^{35}\text{S}$ ), la inmunoprecipitación no produjo el mismo patrón de bandas comparando la cepa SA11 y SACC11. La cepa SA11 mostró las dos bandas ya descritas que corresponden a NSP5 en dos estados distintos de fosforilación (Blackhall y cols., 1997; Poncet y cols., 1997; Afrikanova y cols., 1996). SACC11 mostró también dos bandas correspondientes a NSP5, sin embargo con una pequeña diferencia de movilidad electroforética, observada tanto en los marcajes con  $^{35}\text{S}$ -metionina como con  $^{32}\text{P}$ -ortofosfato. Esto sugiere diferencias en las modificaciones post-traduccionales de cada variante de la proteína. Por otro lado, también es importante el hallazgo de que en el caso de SA11 co-precipitan moléculas correspondientes a casi todas las proteínas virales: VP1, VP2, VP3, VP4, VP6, VP7, NSP2, NSP3 y NSP4. Sin embargo, en el caso de SACC11 co-precipitaron las proteínas del core (VP1, VP2 y VP3), las estructurales VP6 y VP4 y de las no estructurales sólo co-precipitó NSP2 (pero en menor cantidad), que estaría en contacto permanente con NSP5 (Fabbretti y cols., 1999).



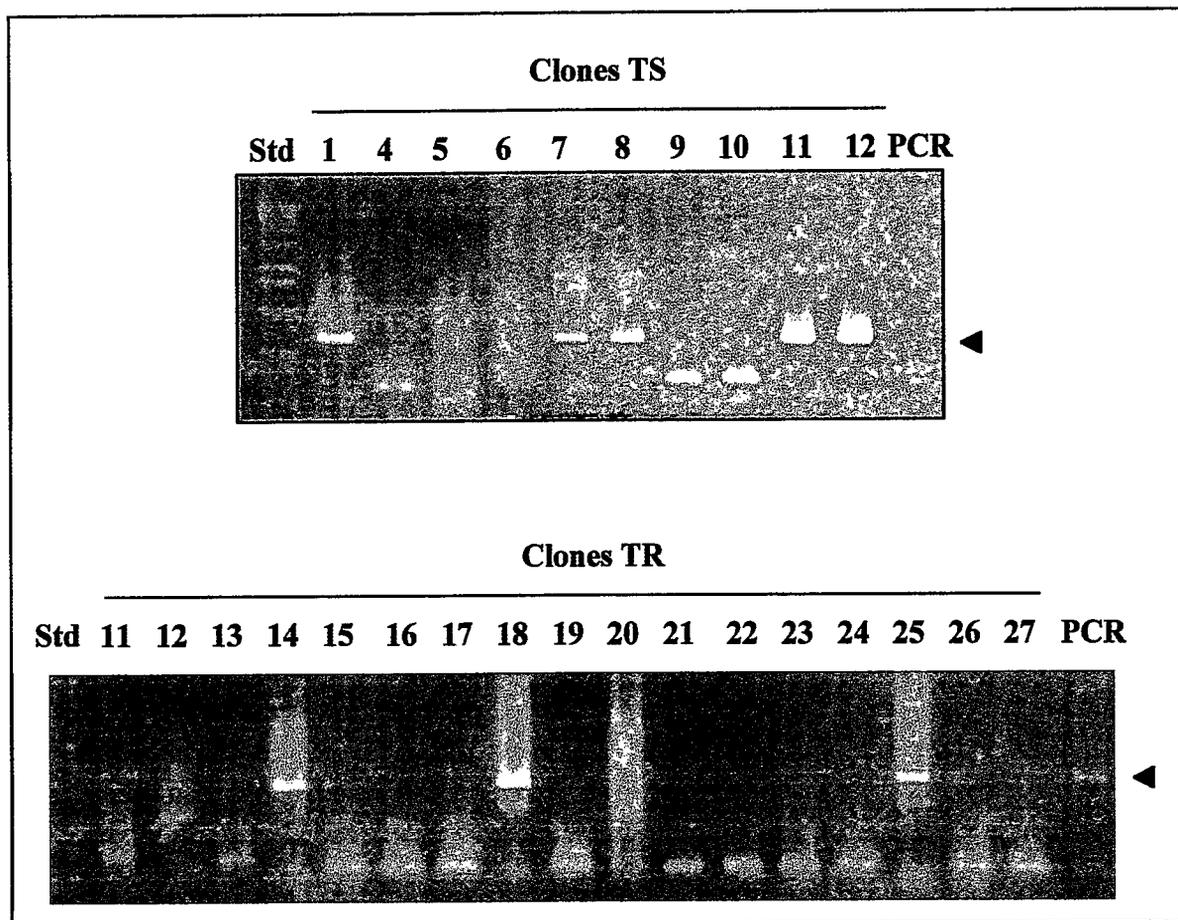
**Figura 16. Inmunoprecipitación de NSP5 proveniente de infecciones.**

Células infectadas fueron marcadas con <sup>35</sup>S-metionina o <sup>32</sup>P-ortofosfato a las 4 h.p.i. y cosechadas a las 6 h.p.i. En los carriles 1 y 2 se ven los lisados marcados con <sup>35</sup>S-metionina. Los lisados fueron posteriormente usados para la inmunoprecipitación. En los carriles 3 y 4 se observan las proteínas inmunoprecipitadas a partir de los lisados mostrados en 1 y 2. En los carriles 5 y 6 se analizaron inmunoprecipitaciones a partir de lisados marcados con <sup>32</sup>P-ortofosfato y en ellos se puede observar NSP5 fosforilada. Al comparar 3 y 4 se puede ver que el patrón de co-precipitación de proteínas es distinto para cada cepa.

### 3.2.- Expresión de NSP5 en *E. coli*.

Para poder estudiar las variantes de NSP5 en más detalles, se procedió al clonamiento de cada uno de los genes para su posterior expresión. Tal como se indicó en los métodos (figura 5), los amplicones obtenidos de reacciones de RT-PCR de cada uno de los segmentos fueron ligados al vector pGEM-T. Después de la transformación y selección, diversos clones fueron analizados por PCR con los mismos partidores usados para la amplificación inicial. En la figura 17 se puede observar el resultado de estas amplificaciones. Los clones positivos se establecieron por comparación con el amplicón original (+). Para el análisis se trabajó con los clones TR14, TR18 y TR25 del segmento 11 rearrreglado y TS1, TS7, TS8, TS11 y TS12 del segmento 11 de la cepa prototipo (SA11). Considerando que este es un trabajo esencialmente comparativo entre dos variantes muy parecidas de una proteína, cada uno de estos 8 clones positivos fue secuenciado por lo menos 3 veces. De esta manera se concluyó que todos los clones TS tenían una mutación en la base 105 (T->C) que es silenciosa en el contexto del marco de lectura. Además, tanto el clon TR18 como el clon TR25 tuvieron una mutación en la base 447 (T->G), que provoca una mutación Ser->Arg en la posición 142 de la proteína. Para los futuros clonamientos se utilizaron los clones TR14 y TS11, que respecto a la numeración del vector están clonados en sentido inverso y directo, respectivamente y que codifican proteínas de secuencia idéntica a la de NSP5 de SACC11 y SA11.

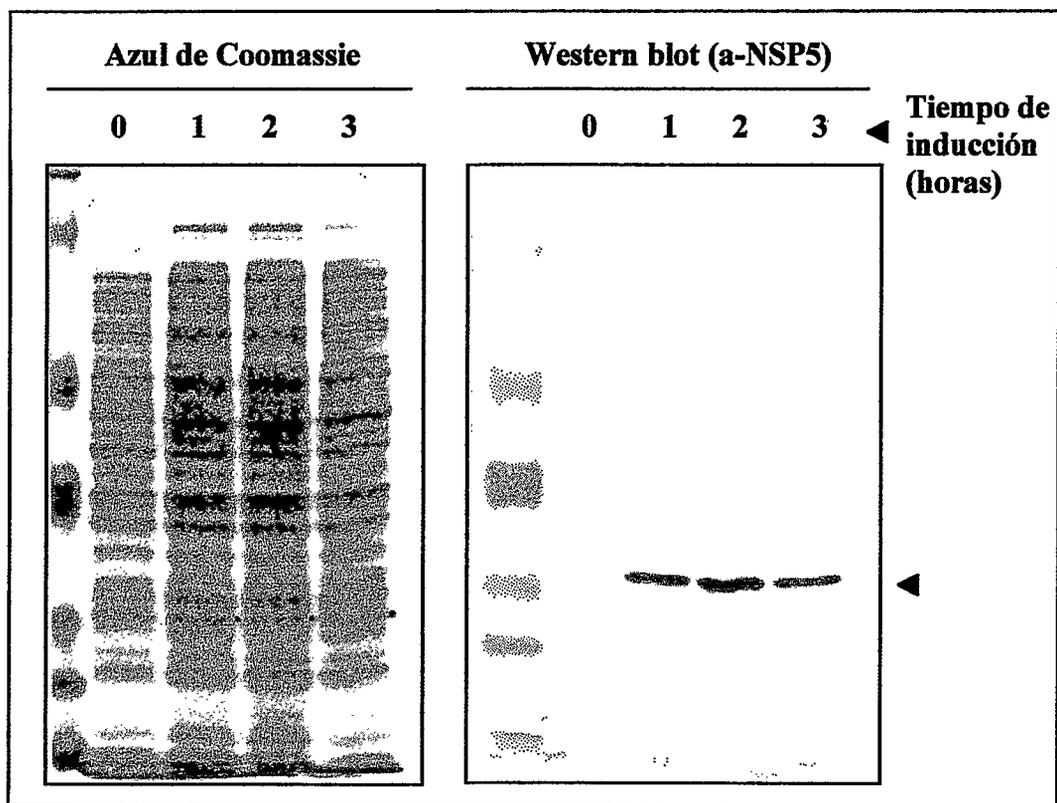
Para el clonamiento en el vector de expresión pQE30, éste fue digerido con las enzimas BamHI/PstI y defosforilado con fosfatasa alcalina. Además, los clones TR14 y TS11 fueron amplificados con una polimerasa de alta fidelidad (Pfu, PROMEGA) y los



**Figura 17. Clonamiento de los segmentos 11: selección por PCR.**

Después del ligamiento y transformación, las colonias obtenidas fueron analizadas por PCR usando partidores de los extremos del inserto. Los clones positivos se identificaron por presentar la misma banda ( ◄ ) de la amplificación original (PCR).

partidores E904 y E905, que incluyen sitios para las mismas enzimas antes mencionadas. Los amplicones obtenidos, corresponden al marco de lectura completo de cada uno de los clones, a excepción de la metionina inicial, que para efectos de expresión es donada por el vector con el dominio 6xHIS en el extremo amino-terminal. Las reacciones de ligamiento entre los amplicones digeridos y el vector antes preparado fueron usadas para transformar bacterias electrocompetentes. Después de una selección en las mismas condiciones que para los clones Tnn (PCR), se verificó que todos los nuevos clones tenían inserto. Después de la secuenciación, los clones Q11-5 y Q14-6 (del segmento estándar y rearrreglado respectivamente), fueron seleccionados para las pruebas de expresión. Los respectivos vectores recombinantes (pQ11-5 y pQ14-6) fueron transferidos a la cepa M15[pRP4] de *E. coli*, para un mejor control de la expresión. El ensayo de expresión se hizo creciendo los clones hasta una O.D.<sub>600</sub> de 0,6, momento en que se hizo la inducción. En la figura 18 se observa la síntesis de la proteína de fusión HIS/NSP5 por el clon Q14-6 a distintos tiempos post-inducción. Se pudo observar que el rendimiento fue relativamente bajo, pues la proteína recombinante no destaca respecto a las demás proteínas de la bacteria (panel izquierdo de la figura 18); sin embargo, es evidente que hay expresión, como lo revela el ensayo de Western blot, revelado tanto con anti-NSP5 como con un monoclonal anti-HIS (específico para el dominio 6xHIS). El resultado fue idéntico tanto para la proteína estándar (pQ11-5; no mostrado) como la proveniente de Rotavirus de cerdo (pQ14-6). De acuerdo a la estrategia aquí descrita, cada una de las variantes de NSP5 clonadas en el vector de expresión resultó con una fusión de 11 aminoácidos en el extremo amino-terminal que constituyen el dominio RGS-6xHIS.



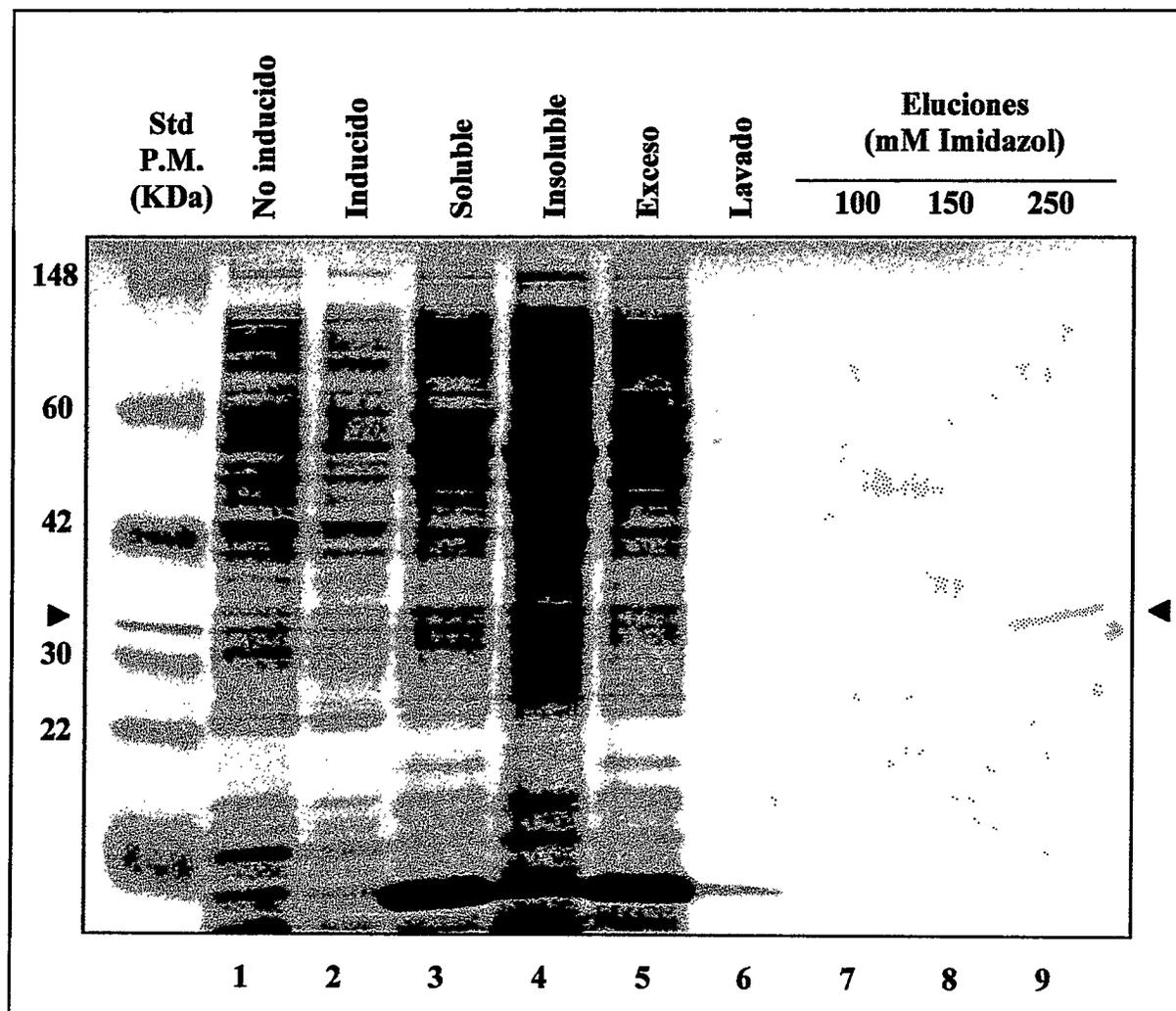
**Figura 18.** Inducción de la expresión de NSP5 en *E. coli*.

El clon Q14-6 fue crecido en medio LB hasta una O.D.<sub>600</sub> de 0,6. Se tomó una fracción como el control sin inducción (tiempo 0). Se adicionó IPTG (inductor) y se retiraron muestras a los tiempos indicados. Las bacterias fueron precipitadas y hervidas en buffer de carga para SDS-PAGE. En el panel de la izquierda se ven las muestras en tinción con azul de Coomassie; a la derecha se observan las mismas muestras detectadas por Western blot, con anticuerpo específico anti-NSP5.

La purificación de las proteínas de fusión recombinantes se realizó en columna de afinidad al dominio 6xHIS utilizando imidazol para su elución final. Después de ensayar diversas condiciones, se llegó al protocolo cuyo resultado se observa en la figura 19. Bacterias con expresión inducida por 4 horas fueron cosechadas y lisadas. La fase soluble obtenida fue adsorbida a la resina NiNTA. Después de lavados con 50 y 100 mM de imidazol, la proteína fue desplazada de la columna con una solución incluyendo 150 mM de imidazol. El lavado final de la columna se hizo con 250 mM de imidazol, terminando así de remover toda la proteína recombinante.

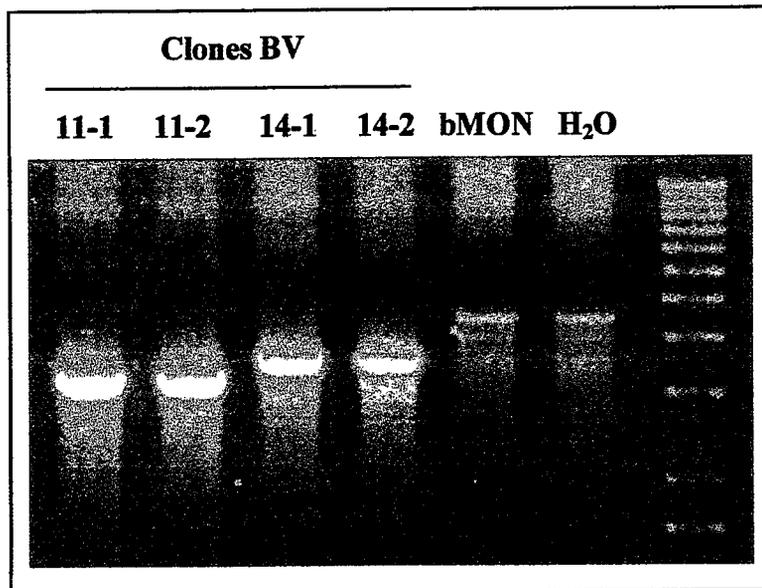
### **3.3.- Expresión de NSP5 en células de insecto.**

Los plasmidios pTS11 y pTR14, antes descritos, se usaron como fuente de insertos para el clonamiento en el vector de expresión eucarionte bMON (figura 5). A través de ensayos de restricción, cada inserto fue transferido al vector pFastBac1. Se obtuvieron 6 clones derivados de pTS11 y 4 clones derivados de pTR14 y –después de verificado el sentido del clonamiento– se seleccionaron los nuevos plasmidios pF11-2 y pF14-2 (respectivamente). Éstos fueron a su vez incorporados por electroporación en la cepa DH10Bac, portadora del bacmidio bMON, al cual debe transferirse el inserto por transposición. La nueva selección de clones se hizo por PCR usando los partidores adyacentes al sitio de transposición en el bacmidio bMON (E987 y E988). En la figura 20 se muestran 2 clones portadores del gen 11 de la cepa SA11 (derivados de pTS11) y 2 clones portadores del gen 11 rearrreglado (derivados de pTR14). De los clones analizados, BV11-1, BV11-2, BV14-1 y BV14-2 fueron seleccionados para la preparación de bacmidio recombinante y posterior transfección en células Sf-9.



**Figura 19. Purificación de la proteína de fusión HIS/NSP5.**

200 ml de cultivo del clon Q14-6 fueron crecidos hasta O.D.600 de 0,6 (carril 1); inducidos con 1 mM de IPTG durante 3 horas (carril 2). Después de lisados se separaron fracciones soluble e insoluble (carriles 3 y 4). La fracción soluble fue adsorbida a una columna NiNTA. En el carril 5 se observan las proteínas no adsorbidas y en el carril 6 el lavado con 50 mM de imidazol. En 7, 8 y 9 se ve la proteína eluida a concentraciones crecientes de imidazol. En el carril del estándar también se incluyó proteína previamente purificada (▶).



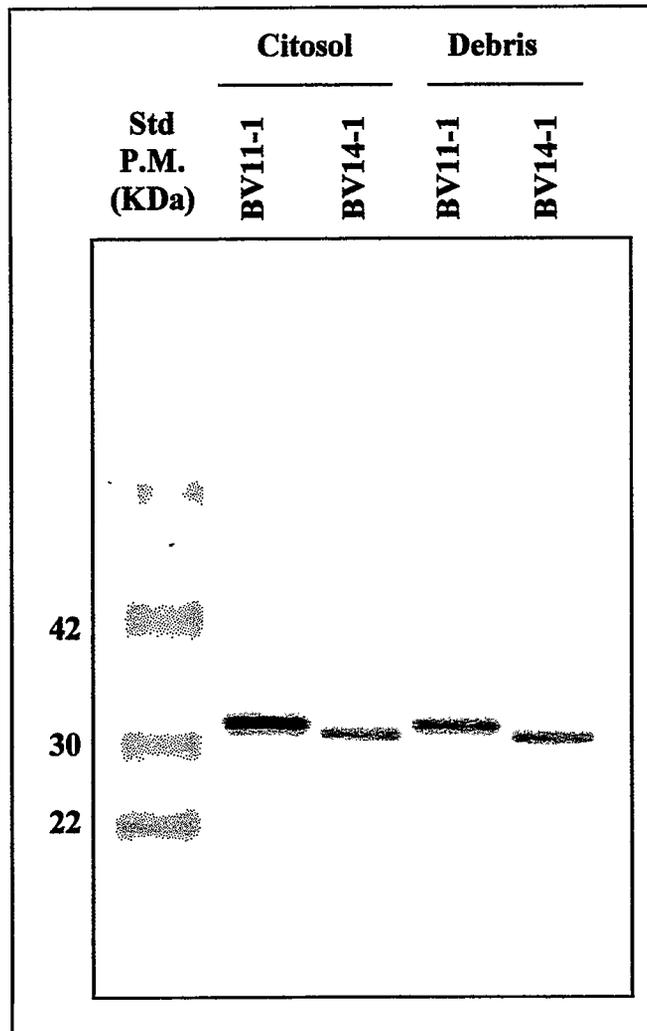
**Figura 20. Clonamiento en Baculovirus: detección por PCR de la transposición.**

Los insertos clonados en pFastBac1 fueron transferidos a la cepa DH10Bac(bMON) para la transposición. Los clones fueron analizados por PCR con partidores del bacmidio bMON, adyacentes al sitio de transposición. En el carril bMON se muestra una amplificación con la bacteria sin transformar.

El primer pasaje post-transfección fue mantenido hasta la lisis del cultivo, obteniéndose así un medio rico en Baculovirus recombinantes. Con este primer pasaje se infectaron nuevas monocapas de Sf-9 para la expresión. Al quinto día post-infección, las células fueron despegadas de su matriz, lavadas con PBS y lisadas. En la figura 21 se puede verificar que efectivamente los clones BV11-1 y BV14-1 expresaron las respectivas proteínas recombinantes. Parte de las proteínas quedaron retenidas en la fracción membranosa del lisado, pero una buena parte también quedó soluble en la fracción del citosol. Es notable en el Western blot la diferencia de migración electroforética entre las dos variantes de la proteína. Al igual que lo observado en las inmunoprecipitaciones (ítem 3.1), la proteína proveniente del Rotavirus de cerdo (segmento 11 rearrreglado), migra sutilmente más rápido que la de la cepa prototipo (SA11), reafirmando que pueden haber diferencias en las modificaciones post-traduccionales de cada una de las variantes.

#### **3.4.- Ensayos de fosforilación de NSP5.**

Si bien otros autores habían visto que NSP5 proveniente de la cepa SA11 tenía actividad auto-quinasa (Blackhall y cols. 1997; Afrikanova y cols. 1996), tal hecho no estaba claro para otras variantes de la proteína, por lo que el próximo paso fue establecer esta actividad en las proteínas recombinantes obtenidas. En el caso de las proteínas expresadas con el vector de tipo Baculovirus, primeramente se sometieron a ensayo de inmunoprecipitación para tener la proteína en una condición más aislada. En el caso de las proteínas expresadas en bacteria, se utilizó las obtenidas después de las purificaciones en columna de afinidad. El ensayo de fosforilación se realizó usando



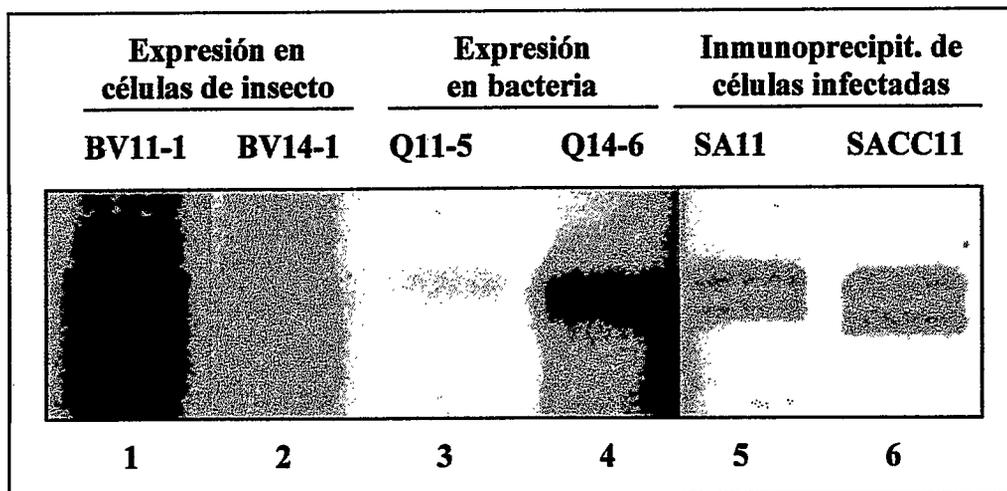
**Figura 21.** Expresión de NSP5 en células de insecto.

Los clones positivos para la transposición del inserto al bacmidio fueron utilizados para transfección a células de insecto. Los baculovirus obtenidos fueron repasados en monocapas de Sf-9. Al quinto día post-infección, las células fueron cosechadas, lisadas y separado el citosol de la fracción membranosa (Debris). Las fracciones fueron analizadas por Western para detectar NSP5 recombinante. A la izquierda se observa el estándar de peso molecular.

[ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP como donador del grupo fosfato. De esta manera, la proteína fosforilada fue detectada por autorradiografía, como se muestra en la figura 22, en donde tanto las proteínas obtenidas por baculovirus, como las expresadas en bacterias muestran fosforilación. Es importante resaltar que la diferencia de movilidad electroforética entre ambas variantes se mantuvo en todos los casos (compárese con el control de inmunoprecipitación de infecciones marcadas con  $^{35}\text{S}$ -metionina en los carriles 5 y 6).

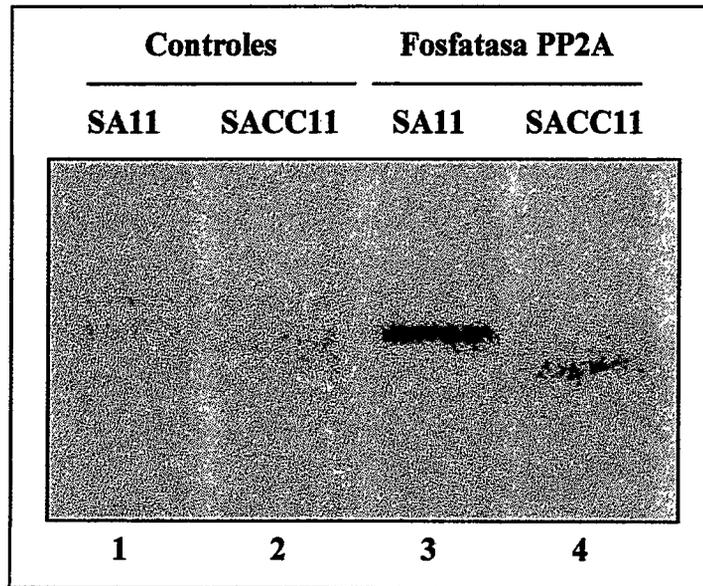
### 3.5.- Desfosforilación de NSP5.

Varias alternativas podrían explicar la diferencia de movilidad electroforética observada siempre entre las dos variantes de NSP5. Una de las posibilidades es un distinto grado de fosforilación, tal como sugiere el análisis de potenciales modificaciones (tabla 1). Las dos bandas observadas en inmunoprecipitaciones están fosforiladas, tal como se puede ver en marcajes con  $^{32}\text{P}$ -ortofosfato (fig. 16). Estudios previos habían demostrado, en el caso de la cepa SA11, que ambas bandas corresponden al mismo polipéptido con distinto grado de fosforilación (Blackhall y cols., 1997). Sin embargo, no se logró remover todos los grupos fosfato, pues a pesar del tratamiento con fosfatasas, la proteína continuó marcada con  $^{32}\text{P}$ . Para verificar si las diferencias entre las dos variantes de NSP5 son exclusivamente por cuenta de fosforilaciones, se sometió a ambas variantes al tratamiento con fosfatasa PP2A. En la figura 23 se puede observar que ambas proteínas tratadas presentaron bandas más intensas, producto de la concentración de proteínas en diversos estados de fosforilación a uno mínimamente fosforilado (Blackhall y cols., 1997; Afrikanova y cols., 1996). La variantes estándar de NSP5 se concentra en una sola banda después del tratamiento con fosfatasa. Esto no es



**Figura 22. Ensayo de actividad kinasa.**

En los carriles 1 y 2 se muestran proteínas expresadas en células de insecto, inmunoprecipitadas y sometidas al ensayo kinasa. En los carriles 3 y 4 se muestran las proteínas expresadas en bacteria y ensayadas después de la purificación en columna de níquel. Ambos experimentos se hicieron con ATP radioactivo según indicado por Poncet y cols. (1997). Como referencia, en los carriles 5 y 6 se ve la proteína original obtenida de infecciones de SA11 y SACC11 en presencia de  $^{32}\text{P}$ -ortofosfato, tal como visto en la figura 16. Así, los carriles impares corresponden a la proteína prototipo (proveniente de SA11) y los pares a la proteína heteróloga (proveniente de SACC11).



**Figura 23. Remoción enzimática de los grupos fosfato de NSP5.**

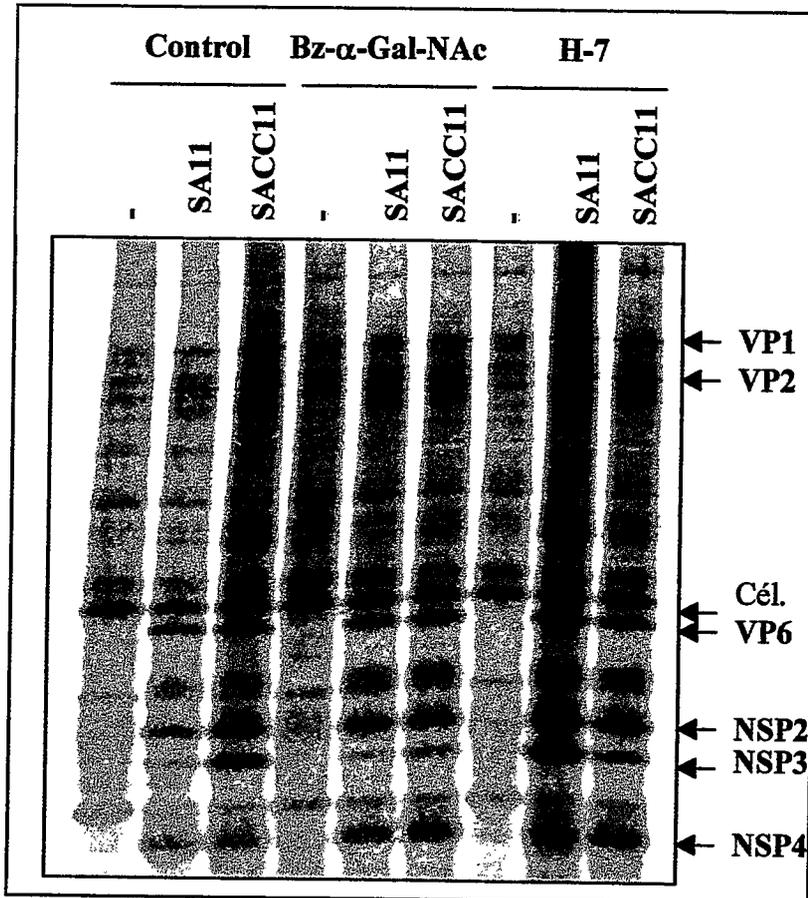
Células infectadas con las dos cepas de Rotavirus fueron marcadas con  $^{35}\text{S}$ -metionina de 4 a 6 h.p.i. Los lisados fueron inmunoprecipitados con anti-NSP5. Mitad de la muestra fue sometida a digestión con fosfatasa PP2A (carriles 3 y 4) y la otra mitad mantenida como control (1 y 2).

así en el caso de la NSP5 de SACC11, pues se mantiene una segunda banda aparentemente resistente a la digestión con PP2A. Esto sugiere un plegamiento distinto de esta variante que deja algunos grupos fosfato menos accesibles a la acción de la fosfatasa. Por otro lado, se verificó que las bandas más intensas de ambas variantes continúan presentando una diferencia de movilidad electroforética.

#### **4.- Efecto de inhibidores de modificaciones post-traduccionales en las infecciones.**

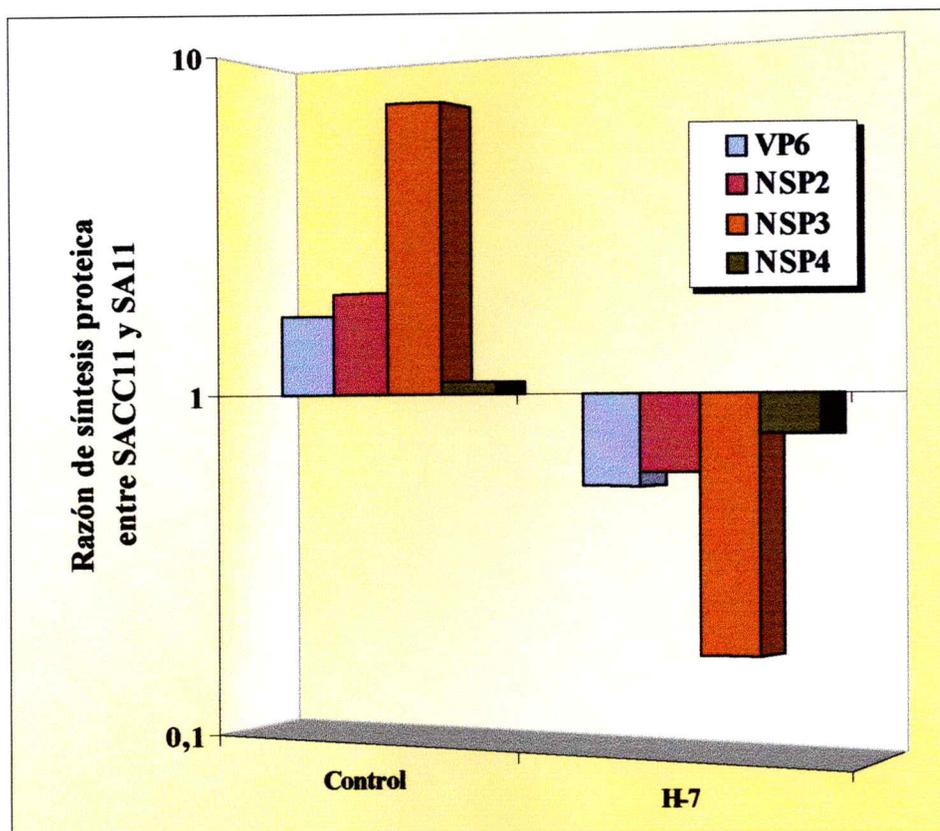
Considerando la posibilidad que diferencias en las modificaciones post-traduccionales de las dos variantes de NSP5 sean las que conllevan a las diferencias fenotípicas entre SA11 y SACC11, se comparó el efecto que inhibidores de fosforilación y O-glicosilación tuvieron en la síntesis de polipéptidos virales durante infecciones de monocapas celulares con cada una de las cepas estudiadas.

Para inhibir fosforilaciones se usó el compuesto H-7, usado anteriormente para inhibir procesos de fosforilación en infecciones virales (Davies y cols., 1991; Yeh y cols., 1996). Para inhibir O-glicosilaciones se usó el compuesto Bz- $\alpha$ -Gal-NAc (Tse y cols., 1994; Kojima y cols., 1992). En la figura 24 se muestra la marcación de polipéptidos virales a tiempos tempranos de infección (4 h.p.i.) en presencia y ausencia de los inhibidores. Como ya se observó en la figura 10, el control sin inhibidores muestra mayor síntesis de proteínas virales por la cepa SACC11. El uso del inhibidor de O-glicosilación provocó un efecto general de decaimiento en la cantidad de proteínas acumuladas para ambas cepas. Por otro lado, el inhibidor de fosforilación tuvo un efecto notable en la cepa SA11, pues en el caso de esta cepa se observan bandas mucho más intensas con H-7 que sin él. Este efecto no fue evidente para la cepa SACC11 cuya



**Figura 24.** Efecto de inhibidores de modificaciones post-traduccionales.

Monocapas infectadas fueron marcadas desde las 2 h.p.i. con  $^{35}\text{S}$ -metionina, mantenidas con el inhibidor especificado y cosechadas a las 4 h.p.i. En cada conjunto se incluyó un control sin infectar para estimar el efecto de los inhibidores en el metabolismo celular.



**Figura 25. Efecto del inhibidor de kinasas H-7 en la síntesis de proteínas virales.**

Se cuantificaron las bandas de los polipéptidos virales mostrados en la figura 24. Después de normalizados los valores respecto a una proteína celular, para cada polipéptido viral se calculó la relación entre el valor para la cepa SACC11 y la SA11. Los cuocientes calculados se graficaron en escala logarítmica. El uso del inhibidor de fosforilación provocó una reversión en la relación de proteínas de SACC11 y SA11.

síntesis proteica no se vio afectada mayormente por la presencia de este inhibidor. Como consecuencia del uso de H-7, la razón de síntesis de proteínas entre las cepas se invirtió (figura 25), lo que sugiere un papel fundamental al grado de fosforilación en el acúmulo de polipéptidos virales. Esto viene a ser concordante con la distinta susceptibilidad que ambas variantes de NSP5 tienen a la fosfatasa PP2A, así como a las diferencias de movilidad electroforética hasta ahora observadas.

## DISCUSIÓN

El estudio del ciclo infectivo de Rotavirus ha permitido establecer un modelo general de los eventos que ocurren a nivel intracelular durante la proliferación del virus. Se ha podido establecer el papel de algunas de las proteínas virales en los procesos de transcripción, traducción, replicación y morfogénesis. En el caso de las llamadas proteínas estructurales se han establecido características funcionales que van más allá de la simple conformación del virión (Estes, 1996).

Por otro lado, se ha propuesto que las proteínas no estructurales tendrían un papel más bien de apoyo en el contexto celular, para dirigir la maquinaria del huésped hacia la producción de la progenie viral (Estes, 1996; Patton, 1995). Esto incluiría funciones accesorias en los procesos de producción de RNA genómico y morfogénesis, tal como lo sugieren los diversos intermediarios de replicación encontrados en estudios de fraccionamiento (Gallegos y Patton, 1989). Sin embargo, los roles precisos de cada una de estas proteínas en el contexto de todos estos procesos no están claramente definidos.

El trabajo aquí descrito se enmarca en el intento por diseccionar el ciclo infectivo de Rotavirus, más precisamente en la definición de un rol para la proteína no estructural NSP5, codificada por el segmento 11 del genoma viral. Para este fin se siguió un enfoque clásico desde el punto de vista genético: se estudiaron las características del microorganismo sustituyendo el gen estándar por un alelo alternativo, manteniendo el

fondo genético. De esta manera, los cambios detectados son atribuibles a la sustitución en cuestión.

Específicamente, el segmento 11 de una cepa heteróloga (CC86) fue transferido al fondo genético de la cepa prototipo SA11, obteniéndose así la cepa SACC11 (Fernández, 1996). El segmento 11 de la cepa SACC11 tiene un mayor tamaño (1002 pb) que el alelo estándar (649 pb), por lo que son distinguibles al analizarse los genomas por electroforesis. Si bien se podría especular al respecto de un efecto del tamaño del segmento en sí (independiente de la proteína codificada), la evidencia experimental apunta más bien a las diferencias de las distintas variantes de NSP5. Para los efectos de esta discusión, se denominará a la NSP5 de la cepa SA11 como p-NSP5 (por prototipo) y a la proveniente de CC86 y transferida a SACC11, h-NSP5 (por heteróloga).

Los resultados aquí descritos apuntan a que NSP5 cumple una función a tiempos tempranos de la infección, pues entre 3 y 4 horas post infección (h.p.i.) la cepa SACC11 presentó características distintas a las de su parental en lo que a síntesis de macromoléculas se refiere. Es de resaltar que las diferencias encontradas a estos tiempos coinciden con el inicio de la síntesis de NSP5, que sucede aproximadamente a las 2 h.p.i. (Blackhall y cols., 1998).

Considerando que fueron encontradas mayores cantidades de mensajeros de SACC11 a tiempos tempranos (figura 14), resulta fácil especular que NSP5 estaría influenciando el proceso de transcripción del virus. Sin embargo, si el único efecto de la h-NSP5 estuviera en la producción de mensajeros, se esperaría encontrar no sólo mayor

síntesis proteica sino además una mayor cantidad de RNA genómico, pues habría mayor disponibilidad de templado para la síntesis de la hebra negativa.

Contrariamente, los resultados muestran que SACC11 sintetiza una menor cantidad de RNA genómico (figura 12), por lo tanto, lo que está ocurriendo es que el RNA mensajero no está siendo utilizado para la replicación. Esto sugiere que la h-NSP5 estaría favoreciendo el proceso de traducción, lo que concuerda con la mayor cantidad de polipéptidos virales encontrados a tiempos tempranos (figura 10).

Hasta el presente no se ha podido demostrar una clara afinidad de NSP5 por ningún tipo de ácido nucleico (Patton, 1995). Esto hace difícil explicar una influencia directa de esta proteína en el destino de los mensajeros, tal como se ha sugerido en el párrafo anterior. Probablemente, el efecto observado en la cepa SACC11 obedece a un papel más bien indirecto de h-NSP5.

Aparte de un posible proceso de dimerización, la única interacción claramente definida para NSP5 es con la proteína NSP2 (Fabbretti y cols., 1999; González y cols., 1998). Se ha sugerido inclusive que esta interacción daría cuenta de la formación de la estructura subcelular conocida como viroplasma, en donde ocurre la replicación del genoma viral (Fabbretti y cols., 1999). Por otro lado, se ha demostrado que NSP2 tiene afinidad no específica por RNA, por lo que se ha propuesto una función de transporte de los mensajeros virales hacia el viroplasma (Kattoura y cols., 1992). Estos antecedentes sumado al fenómeno de direccionamiento preferencial de los mensajeros hacia la traducción observado con h-NSP5, permiten sugerir una influencia de esta proteína en el comportamiento de NSP2. De hecho, la figura 16 muestra que el patrón de interacciones

de NSP5 es distinto para cada una de las variantes, observándose menor co-precipitación de NSP2 en el caso de h-NSP5. Habiendo una interacción más débil con NSP2, probablemente se impide el rápido direccionamiento de los mensajeros hacia la replicación, dejando de esta manera una mayor disponibilidad de ellos para la traducción. Este cambio en el comportamiento de h-NSP5 con respecto a NSP2 podría deberse tanto a las diferencias aminoacídicas con respecto a p-NSP5 o a un patrón de modificaciones post-traduccionales distinto, tal como se discute más adelante.

La cepa CC86, cuando se compara con la cepa CN86, presenta los fenotipos descritos como "placa grande" y "sobrecrecimiento" (Mattion y cols., 1990); estas características pueden ser explicadas tanto por la síntesis de mayor cantidad de partículas infectivas como por una morfogénesis más temprana.

Si bien no se puede descartar un efecto aditivo de otros genes distintos, es muy factible pensar que dichos fenotipos se deban a las variaciones encontradas en la proteína h-NSP5, una vez que ellos fueron transferidos a la cepa SACC11. Las diferencias en la secuencia aminoacídica entre h-NSP5 y p-NSP5 son de 14 aminoácidos, es decir, menos del 10%. Sin embargo, al comparar las secuencias entre CN86 y CC86, las diferencias se reducen a apenas 4 aminoácidos (figura 5, aminoácidos 116, 119, 132 y 142).

Por las características antes mencionadas y el análisis de las secuencias, cabría pensar que estos 4 residuos distintos son la causa de fenotipos tan visibles como son la placa grande y el sobrecrecimiento, así como de las características observadas en

términos de la síntesis anticipada de proteínas y subpartículas virales. Siendo 4 ó 14 aminoácidos, las diferencias son relativamente pocas y dado el hecho de que NSP5 es una fosfoproteína, es plausible entonces que estas diferencias estén variando el patrón de modificaciones post-traduccionales de la proteína y que de estas variaciones se deriven los efectos en la síntesis anticipada de proteínas, subpartículas y finalmente partículas infectivas que puedan a su vez conllevar a los fenotipos de placa grande y sobrecrecimiento.

Previamente se ha demostrado que la variante p-NSP5 está fosforilada (Welch y cols., 1989) y además O-glicosilada (González y Burrone, 1991), lo que podría sugerir un papel regulatorio para esta proteína. Aunque se sabe que la mayor parte de modificaciones ocurren en residuos de serina, hasta hoy no se ha podido definir cuales exactamente están modificados. En esta tesis se confirmó que la variante h-NSP5 está fosforilada (figura 16, panel B), confirmando así la relevancia de esta modificación en la funcionalidad de la proteína. No se ha confirmado, sin embargo, si también esta variante está sujeta a la glicosilación antes mencionada, aunque usando un algoritmo de predicción de O-glicosilación (Gupta y cols., 1999), se presumen modificaciones de este tipo también.

Estudios previos han mostrado que si bien cierto grado de fosforilación de NSP5 está dado por su actividad auto-quinasa, durante la infección serían importantes las enzimas quinasa de origen celular (Afrikanova y cols., 1996). En el caso de la h-NSP5 se demostró que tanto expresada en sistema procarionte como en células de insecto, también tiene actividad auto-protein-quinasa (figura 22). Estudios enzimáticos más

detallados tales como la búsqueda de substratos, comparaciones cinéticas y el mapeo de dominios funcionales, podrán indicar si existen diferencias relevantes en la eficiencia de esta variante.

Todos los estudios previos muestran que p-NSP5 de células infectadas se presenta en dos isoformas con migraciones aproximadas correspondientes a 26 y 28 KDa. La proteína h-NSP5 de SACC11 también presentó dos bandas en electroforesis, pero ambas tienen una migración más rápida que las de p-NSP5, proveniente de SA11. Un estudio previo había sugerido que p-NSP5 tendría una migración más rápida cuando no estaba O-glicosilada (traducción *in vitro*, Afrikanova y cols., 1996). Sin embargo, se descartó que la diferencia de movilidad electroforética entre las dos variantes aquí estudiadas se debiera a la O-glicosilación porque cuando ambas variantes fueron expresadas en bacteria, la diferencia de movilidad persistió. De esta manera, las alternativas para la explicación de la diferencia de migración se reducen a: i) un distinto peso molecular por cuenta de los 14 aminoácidos; ii) un distinto grado de fosforilación o iii) una estructura terciaria demasiado distinta. Las dos últimas explicaciones, considerando un importante cambio estructural, también podrían sugerir diferencias en términos de la funcionalidad de la proteína.

En el caso de proteínas expresadas en sistema procarionte no se esperan ni glicosilaciones ni fosforilaciones en Serina o Treonina. Sin embargo, la actividad autoquinasa de NSP5 tendría como consecuencia que la proteína esté siendo obtenida fosforilada, pues se ha demostrado que el único requerimiento para esta reacción es un nucleósido trifosforado donador del radical fosfato. Dado este antecedente, se intentó

demostrar si las diferencias de movilidad electroforética entre las variantes de NSP5 estaban dadas por un mayor o menor grado de fosforilación. Estudios previos (Blackhall y cols., 1997; Poncet y cols., 1997) habían demostrado que todas las isoformas de NSP5 pueden ser reducidas a una sola cuando son tratadas con PP2A, protein-fosfatasa (PROMEGA). Sin embargo, en la isoforma de menor peso molecular persiste cierto grado de fosforilación como lo muestran los ensayos con proteína marcada con  $^{32}\text{P}$ , es decir, no todos los radicales fosfato son accesibles a la acción de la fosfatasa. El ensayo simultáneo con fosfatasa PP2A de las dos variantes de NSP5 (figura 23) confirmó los resultados anteriores para p-NSP5, pero no logró definir si la diferencia de movilidad de h-NPS5 proviene de un distinto grado de fosforilación, pues además de persistir la diferencia de movilidad entre las bandas de menor tamaño, también se observó que h-NSP5 es menos susceptible aún a la digestión con fosfatasa, observándose la persistencia de la banda de menor migración (a menor fosforilación, mayor movilidad electroforética). Este último resultado sugiere más bien un plegamiento diferente de h-NSP5, lo que impediría la acción de la fosfatasa en residuos que normalmente son accesibles en el caso de p-NSP5.

Este resultado se proyecta en términos de la funcionalidad de la h-NSP5 en el contexto del ciclo infeccioso de SACC11. Previamente se ha sugerido que durante la infección, el grado de fosforilación de NSP5 esté determinado por un equilibrio entre actividades quinasa y fosfatasa (Blackhall y cols., 1998). Así, si h-NSP5 tiene un plegamiento distinto a p-NSP5, probablemente su cinética de fosforilación/defosforilación también podría ser distinta. De aquí se respalda la

hipótesis de que las diferencias observadas entre las cepas SA11 y SACC11 (placa grande, sobrecrecimiento y síntesis de macromoléculas) podrían en última instancia deberse al distinto grado de fosforilación de sus respectivas NSP5.

Al igual que con las fosforilaciones, hasta este momento no se ha podido definir un verdadero rol a la O-glicosilación de NSP5 (González y Burrone, 1991). Por analogía a lo observado en otras proteínas, se ha sugerido que la O-glicosilación podría estar equilibrando el grado de fosforilación al existir una competencia por los residuos de la proteína (Afrikanova y cols., 1996; Fabbretti y cols., 1999). Según este modelo, un menor grado de O-glicosilación facilitaría la fosforilación de NSP5 y viceversa. Para contextualizar los fenómenos observados al comparar p-NSP5 y h-NPS5, se experimentó el efecto que inhibidores de modificaciones post-traduccionales tenían en el ciclo infeccioso.

Dada la necesidad que las células eucariontes tienen de los sistemas de modificación post-traduccionales, el uso de inhibidores usualmente va acompañado de un efecto negativo en su homeostasis. Para la O-glicosilación de proteínas, el único inhibidor descrito con una buena especificidad es el benzyl- $\alpha$ -Gal-NAc (Kojima y cols., 1992). Los resultados del uso de este inhibidor durante las infecciones con SA11 y SACC11 mostraron un efecto general de disminución en la síntesis de proteínas, reflejando probablemente un daño al equilibrio celular demasiado importante como para permitir el estudio de un fenómeno posterior como es la infección por el virus. Por esta razón no se pudo asociar el efecto in vivo de un posible menor grado de O-glicosilación

de NSP5 ni tampoco si una de las dos variantes se vería más menos afectada por este fenómeno.

El uso de inhibidores de fosforilación es más complejo debido al hecho de que en las células eucariontes existen diversos tipos de enzimas con actividad de proteinquinasa. El inhibidor escogido durante este estudio fue el H-7, inhibidor de quinasas del grupo PKC, pues sabíamos de antemano que NSP5 está fosforilada en residuos de serina (Blackhall y cols., 1997) y estudios previos ya habían mostrado que este inhibidor afectaba la replicación de otros virus regulados por medio de fosfoproteínas virales (Davies y cols., 1991; Yeh y cols., 1996). Inicialmente se procuró observar el efecto del H-7 en las características más impactantes de la cepa SACC11 como son la placa grande y el sobrecrecimiento. Sin embargo, no fue observado un efecto notable (datos no mostrados), aparentemente debido a que estos experimentos demoran días (por las infecciones sucesivas), lo que podría afectar la disponibilidad del compuesto inhibidor, cuya duración en el medio de cultivo no está bien establecida. Así, se estudió el efecto de H-7 en la síntesis de proteínas durante las infecciones con SA11 y SACC11 donde ya se había establecido una diferencia importante a las 4 h.p.i. (figura 10). Los resultados mostraron que la cepa SACC11 no vio mayormente afectada la síntesis de polipéptidos virales en la presencia de 50  $\mu$ M de H-7 (figura 24). Sin embargo, la cepa SA11 evidenció un aumento muy pronunciado en la síntesis de sus polipéptidos virales, tal como se puede observar en las figuras 24 y 25. Una vez más, considerando que ambos sistemas sólo difieren en la NSP5 de cada cepa, se puede atribuir a esta proteína la causa del aumento de la síntesis proteica detectado en la cepa SA11. Considerando los

antecedentes relativos a NSP5, es factible pensar que diferencias en la fosforilación de esta misma proteína podrían ser los responsables del cambio observado. No se puede, sin embargo, descartar la alternativa de que procesos de fosforilación de proteínas celulares estén siendo alterados y eso provoque un efecto indirecto sobre NSP5, más notorio en la cepa SA11 que en SACC11.

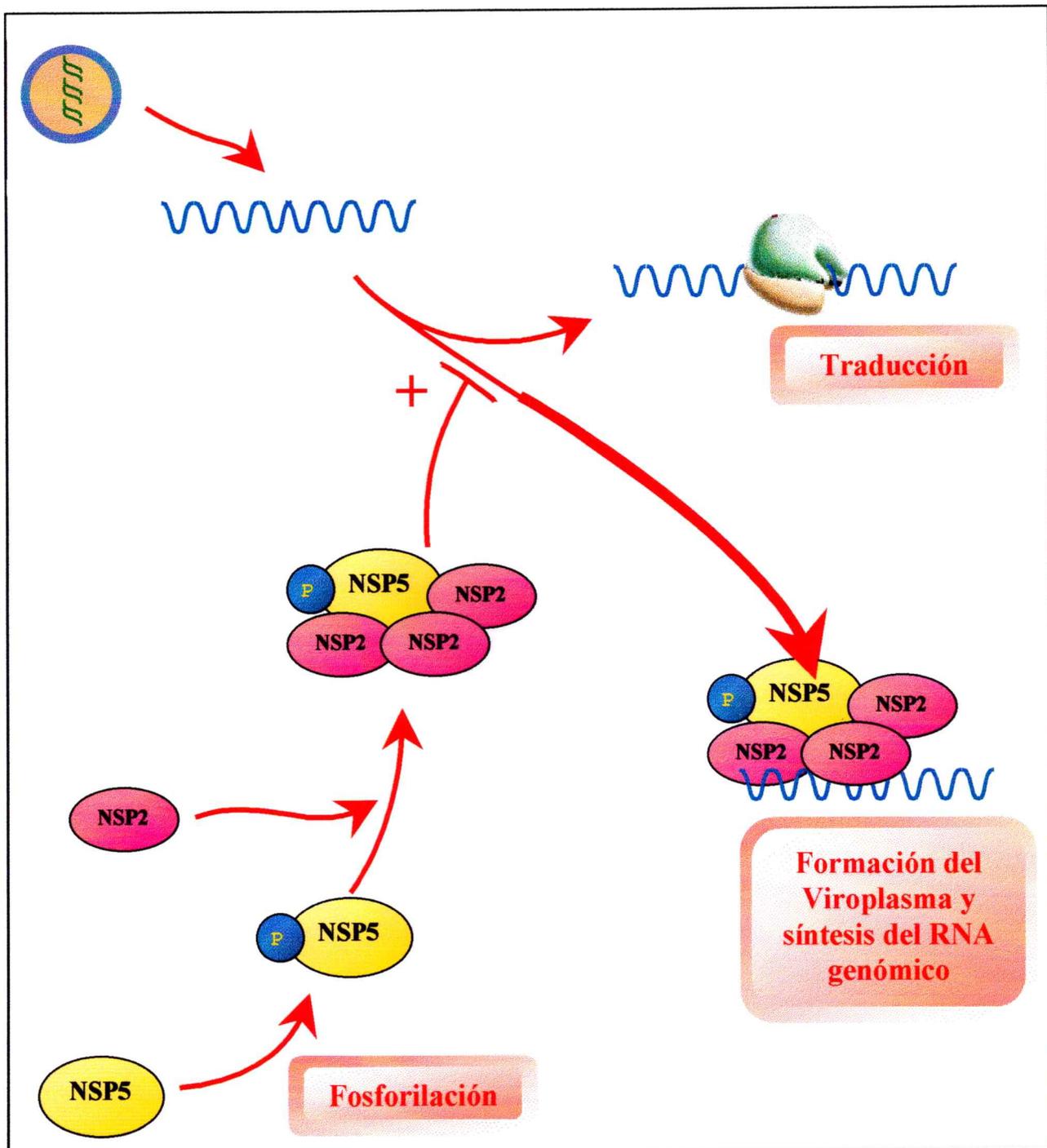
Al relacionar estos resultados con los mencionados anteriormente, se puede presentar un modelo según el cual el grado de fosforilación de NSP5 (sea por actividad auto-quinasa o por cuenta de quinasas celulares) estaría afectando las interacciones de esta fosfoproteína con otros polipéptidos virales, más precisamente con NSP2. Esta regulación en la interacción sería a su vez determinante en la estructuración de los viroplasmatas, lugar donde ocurre la síntesis del RNA genómico del virus y su posterior morfogénesis.

En el caso de la cepa SACC11, portadora de la proteína h-NSP5, un menor grado de fosforilación explicaría las diferentes características encontradas en este estudio (tabla 2). La proteína h-NSP5 menos fosforilada (y consecuente con mayor movilidad electroforética) regularía negativamente la interacción con NSP2, lo que favorecería la traducción temprana de los mensajeros (a costo de una menor producción de dsRNA genómico); esto a su vez, permitiría que ocurra morfogénesis a tiempos más tempranos (figura 9) y una eventual lisis más temprana. Esto permitiría explicar a su vez los fenotipos de placa grande (propagación a tiempos más cortos de célula a célula) así como el de sobrecrecimiento (la cepa SACC11 efectúa el segundo ciclo de infecciones antes por tener anterior disponibilidad de partículas infectivas).

**Tabla 2. Características estudiadas en las cepas SA11 y SACC11.**

Características estudiadas	SA11 (p-NSP5)	SACC11 (h-NSP5)
Placas grandes	-	++
Sobrecrecimiento	-	++
Localización en viroplasma	+	+
Síntesis temprana de subpartículas	-	++
Síntesis temprana de proteínas virales	-	++
Síntesis temprana de RNA genómico	++	-
Síntesis temprana de mRNA viral	+	++
Mayor movilidad electroforética de NSP5	-	++
Interacción con otras proteínas virales	++	+
Fosforilación de NSP5	++	++
O-glicosilación de NSP5	++	¿?
Susceptibilidad a fosfatasa	++	+
Efecto del inhibidor de fosforilación (H-7) en la síntesis de proteínas	++	-

El modelo aquí presentado (figura 26), es absolutamente concordante con las informaciones que se cuentan de cada una de las proteínas no estructurales (Patton, 1995; Estes, 1996). Hasta donde lo muestra la literatura, este es el primer ejemplo en el que se propone un rol para una proteína no estructural de Rotavirus usando un enfoque genético clásico por medio de una cepa obtenida por reordenamiento genético.



**Figura 26. Modelo de regulación ejercida por NSP5 en el ciclo infeccioso.**

El grado de fosforilación de NSP5 determinaría su interacción con NSP2. La estructura formada por multímeros de NSP2 y NSP5 secuestraría los mensajeros para formar el viroplasma y replicar el genoma viral. En la ausencia de esta estructura, el mensajero es utilizado para la traducción.

## CONCLUSIONES

- La cepa SACC11 tiene un patrón de síntesis de macromoléculas distinto al de su parental SA11, lo que explicaría las diferencias fenotípicas entre ambas cepas.
- No pudiendo descartarse el efecto del tamaño del segmento 11 rearrreglado, las diferencias de la proteína h-NSP5 son causantes del patrón de síntesis de macromoléculas.
- El rol de NSP5 empieza a ser determinante a tempranas horas del ciclo infectivo.
- El doble papel atribuido a los mensajeros virales, templado para la síntesis de RNA genómico y para la traducción, es regulado por NSP5, siendo esta regulación probablemente indirecta, a través de interacción con NSP2.
- La regulación que NSP5 ejerce en el destino de los mensajeros virales es dependiente del grado de fosforilación de esta proteína, aunque no se descarta un papel a proteínas quinasa de origen celular.

## BIBLIOGRAFÍA

- Afrikanova, I., Miozzo, M.C., Giambiagi, S. and Burrone, O. 1996. Phosphorylation generates different forms of rotavirus NSP5. *J. Gen. Virol.* 77: 2059-2065.
- Afrikanova, I., Fabbretti, E., Miozzo, M.C. and Burrone, O. 1998. Rotavirus NSP5 phosphorylation is up-regulated by interaction with NSP2. *J. Gen. Virol.* 79: 2679-2686.
- 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(2): 985-991.
- Ardern-Holmes, S.L., Lennon, D., Pinnock, R., Nicholson, R., Graham, D., Teele, D., Schousboe, M., Gillies, M., Hollis, B., Clarkin, A.-M., Lindeman, J. and Stewart, J. 1999. Trends in hospitalization and mortality from Rotavirus disease in New Zealand infants. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 18(7): 614-619.
- Au, K.-S., Mattion, N.M. and Estes, M.K. 1993. A subviral particle binding domain on the Rotavirus nonstructural glycoprotein NS28. *Virology* 194:665-673.
- Ball, J.M., Tian, P., Zeng, C.Q.-Y., Morris, A.P. and Estes, M.K. 1996. Age-dependent diarrhea induced by a Rotaviral Nonstructural glycoprotein. *Science* 272: 101-104.
- Barber, S.A., Flaherty, M.T., Plafker, S.M. and Clements, J.E. 1998. A novel kinase activity associated with Nef derived from neurovirulent simian immunodeficiency virus. *Virology* 251: 165-175.
- Barik, S., McClean, T. and Dupuy, L.C. 1995. Phosphorylation of Ser<sup>232</sup> directly regulates the transcriptional activity of the P protein of human Respiratory Syncytial Virus: phosphorylation of Ser<sup>237</sup> may play an accessory role. *Virology* 213: 405-412.
- Bern, C., Martines, J., de Zoysa, I. and Glass R.I. 1992. The magnitude of the global problem of diarrhoeal disease: a ten year update. *Bull. World Health Organ.* 70:705-714.
- Bishop, R. 1999. Ruth Bishop: Rotaviruses and vaccines. *Lancet* 353: 1860.
- Black, R.E., Merson, M.H., Rahman, A.S.M.M., Yunus, M., Alim, A.R.M.A., Huq, I., Yolken, R.H. and Curlin, G.T. 1980. A two-year study of bacterial, viral and parasitic agents associated with diarrhea in rural Bangladesh. *J. Infect. Dis.* 142(5): 660-664.

- Blackhall, J., Fuentes, A. and Magnusson, G. 1996. Genetic stability of a porcine Rotavirus RNA segment during repeated plaque isolation. *Virology* 225: 181-190.
- Blackhall, J., Fuentes, A., Hansen, K. and Magnusson, G. 1997. Serine protein kinase activity associated with Rotavirus phosphoprotein NSP5. *J. Virol.* 71(1): 138-144.
- Blackhall, J., Muñoz, M., Fuentes, A. and Magnusson, G. 1998. Analysis of Rotavirus nonstructural protein NSP5 phosphorylation. *J. Virol.* 72(8): 6398-6405.
- Burke, B. and Desselberger, U. 1996. Rotavirus pathogenicity. *Virology* 218: 299-305.
- Chen, D., Burns, J.W., Estes, M.K. and Ramig, R.F. 1989. Phenotypes of Rotavirus reassortants depend upon the recipient genetic background. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 3743-3747.
- Ciarlet, M. and Estes, M.K. 1999. Human and most animal Rotavirus strains do not require the presence of sialic acid on the cell surface for efficient infectivity. *J. Gen. Virol.* 80: 943-948.
- Clapp, L.L. and Patton, J. 1991. Rotavirus morphogenesis: domains in the major inner capsid protein essential for binding to single-shelled particles and for trimerization. *Virology* 180: 697-708.
- Cook, S.M., Glass, R.I., LeBaron, C.W. and Ho, M.-S. 1990. Global seasonality of Rotavirus infections. *Bull. World Health Organ.* 68(2): 171-177.
- Davies, A.H., Grand, R.J.A., Evans, F.J. and Rickinson, A.B. 1991. Induction of Epstein-Barr Virus lytic cycle by tumor-promoting and non-tumor-promoting phorbol esters requires active Protein Kinase C. *J. Virol.* 65(12): 6838-6844.
- Desselberger, U. 1996. Genome rearrangements of Rotaviruses. *Adv. Virus Res.* 46: 69-95.
- Estes, M.K. 1996. Rotaviruses and their replication. In *Fields Virology*, 3<sup>a</sup> ed., pp 1625-1655. Edited by Fields, B.N., Knipe, D.M. and Howley, P.M. Lippincott-Raven, Philadelphia, Pa.
- Fabbretti, E., Afrikanova, I., Vascotto, F. and Burrone, O. 1999. Two non-structural rotavirus proteins, NSP2 and NSP5, form viroplasm-like structures in vivo. *J. Gen. Virol.* 80: 333-339.
- Fernández, J. 1996. Caracterización molecular de una cepa reordenante de Rotavirus de Cerdo. Tesis Doctoral, Universidad de Chile.

- Fukudome, K., Yoshie, O. and Konno, T. 1989. Comparison of human, simian and bovine Rotaviruses for requirement of Sialic acid in hemagglutination and cell adsorption. *Virology* 172: 196-205
- Gallegos, C.O. and Patton, J. 1989. Characterization of rotavirus replication intermediates: a model for the assembly of single-shelled particles. *Virology* 172(2): 616-627.
- Gomes, T.A.T., Rassi, V., MacDonald, K.L., Ramos, S.R.T.S., Trabulsi, L.R., Vieira, M.A.M., Guth, B.E.C., Candeias, J.A.N., Ivey, C., Toledo, M.R.F. and Blake, P.A. 1991. Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in São Paulo, Brazil. *J. Infect. Dis.* 164: 331-337.
- González, S.A. and Burrone, O.R. 1991. Rotavirus NS26 is modified by addition of Single O-linked residues of N-Acetylglucosamine. *Virology* 182: 8-16.
- González, R.A., Torres-Vega, M.A., López, S. and Arias, C.F. 1998. In vivo interactions among Rotavirus nonstructural proteins. *Arch. Virol.* 143: 981-996.
- Gupta, R., Birch, H., Rapacki, K., Brunak, S. and Hansen, J.E. 1999. O-GLYCBASE version 4.0: a revised database of O-glycosylated proteins. *Nucleic Acids Res.* 27(1): 370-372.
- Helmberger-Jones, M. and Patton, J. 1986. Characterization of subviral particles in cells infected with simian rotavirus SA11. *Virology* 155: 655-665.
- Herring, A.J., Inglis, N.F., Ojeh, C.K., Snodgrass, D.R. and Menzies, J.D. 1982. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver stained polyacrylamide gels. *J. Clin. Microbiol.* 16: 473-477.
- Hoffmann, K., Bucher, P., Falquet, L. and Bairoch, A. 1999. The PROSITE Database: its status in 1999. *Nucleic Acids Res.* 27(1): 215-219.
- Huilan, S., Zhen, L.G., Mathan, M.M., Mathew, M.M., Olarte, J., Espejo, R., Maung, K., Ghafoor, M.A., Khan, M.A., Sami, Z. and Sutton, R.G. 1991. Etiology of acute diarrhea among children in developing countries: a multicentre study in five countries. *Bull. World Health Organ.* 69(5): 549-555.
- Joensuu, J., Koskenniemi, E. and Vesikari, T. 1998. Prolonged efficacy of rhesus-human reassortant Rotavirus vaccine. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 17(5): 427-429.
- Kaljot, K.T., Shaw, R.D., Rubin, D.H. and Greenberg, H.B. 1988. Infectious Rotavirus enters cells by direct cell membrane penetration, not by endocytosis. *J. Virol.* 62(4): 1136-1144.

- Kapikian, A.Z. 1996. Overview of viral gastroenteritis. *Arch. Virol.* 12: 7-19.
- Kapikian, A.Z. and Chanock, R.M. 1996. Rotaviruses. In *Fields Virology*, 3<sup>rd</sup> ed., pp 1657-1708. Edited by Fields, B.N., Knipe, D.M. and Howley, P.M. Lippincott-Raven, Philadelphia, Pa.
- Kattoura, M.D., Clapp, L.L and Patton, J. 1992. The Rotavirus nonstructural protein, NS35, possesses RNA-binding activity *in vitro* and *in vivo*. *Virology* 191: 698-708.
- Kojima, K., Taniguchi, K., Urasawa, T. and Urasawa, S. 1996. Sequence analysis of normal and rearranged NSP5 genes from human Rotavirus strains isolated in nature: implications for the occurrence of the rearrangement at the step of plus strand synthesis. *Virology* 224: 446-452.
- Kojima, N., Handa, K., Newman, W. and Hokomori, S. 1992. Inhibition of selectin-dependent tumor cell adhesion to endothelial cells and platelets by blocking O-glycosylation of these cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 182(3): 1288-1295.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227: 680-685.
- Maass, D.R. and Atkinson, P.H. 1990. Rotavirus proteins VP7, NS28 and VP4 form oligomeric structures. *J. Virol.* 64(6): 2632-2641.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. 1982. *Molecular Cloning* Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.
- Mattion, N.M., Bellinzoni, R.C., Blackhall, J., Estes, M.K., González, S., La Torre, J.L. and Scodeller, E.A. 1990. Genome rearrangements in porcine rotaviruses: biochemical and biological comparisons between a supershort strain and its standard counterpart. *J. Gen. Virol.* 71: 355-362.
- Mattion, N.M., Cohen, J. and Estes, M.K. 1994. Rotavirus proteins. In *Viral infections of the gastrointestinal tract*, pp 169-249. Edited by Kapikian, A. Marcel Dekker, Inc. New York, NY.
- Meyer, J.C., Bergmann, C.C. and Bellamy, A.R. 1989. Interaction of Rotavirus cores with the nonstructural glycoprotein NS28. *Virology* 171: 98-107.
- Patton, J. 1995. Structure and function of the rotavirus RNA-binding proteins. *J. Gen. Virol.* 76: 2633-2644.
- Patton, J. and Gallegos, C.O. 1988. Structure and protein composition of the Rotavirus replicase particle. *Virology* 166: 358-365.

- Pérez, J.F., Chemello, M.e., Liprandi, F., Ruiz, M.-C. and Michelangeli, F. 1998. Oncosis in MA104 cells is induced by Rotavirus infection through an increase in intracellular  $Ca^{2+}$  concentration. *Virology* 252:17-27.
- Piron, M., Vende, J., Cohen, J. and Poncet, D. 1998. Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4G1 and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F. *EMBO J.* 17(19): 5811-5821.
- Pizarro, J.L., Sandino, A.M., Pizarro, J.M., Fernández, J. and Spencer, E. 1991. Characterization of Rotavirus guanylyltransferase activity associated with polypeptide VP3. *J. Gen. Virol.* 72: 325-332.
- Poncet, D., Lindenbaum, P., L'Haridon, R. and Cohen, J. 1997. In vivo and in vitro phosphorylation of Rotavirus NSP5 correlates with its localization in viroplasms. *J. Virol.* 71(1): 34-41.
- Poruchynsky, M.S. and Atkinson, P.H. 1991. Rotavirus protein rearrangements in purified membrane-enveloped intermediate particles. *J. Virol.* 65(9): 4720-4727.
- Prasad, B.V.V., Wang, G.J., Clerx, J.P.M. and Chiu, W. 1988. Three-dimensional structure of rotavirus. *J. Mol. Biol.* 199: 269-275.
- Prasad, B.V.V., Rothnager, R., Zeng, C.Q.-Y., 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 (London)* 382: 471-473.
- Ramig, R.F. 1997. Genetics of the Rotaviruses. *Annu. Rev. Microbiol.* 51: 225-255.
- Roach, P.J. 1991. Multisite and hierarchal protein phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 266(22): 14139-14122.
- Sandino, A.M. 1990. Función de la cápside interna en la transcripción "in vitro" de Rotavirus. Tesis Doctoral, Universidad de Chile.
- Soler, C., Musalem, C., Loroño, M. and Espejo, R.T. 1982. Association of viral particles and viral proteins with membranes in SA-11 infected cells. *J. Virol.* 44(3): 983-992.
- Srnka, C.A., Tiemeyer, M., Gilbert, J.H., Moreland, M., Schweingruber, H., De Lappe, B.W., James, P.G., Gant, T., Willoughby, R.E., Yolken, R.H., Nashed, M.A., Abbas, S.A. and Laine, R.A. 1992. Cell surface ligands for Rotavirus: mouse intestinal glycolipids and synthetic carbohydrate analogs. *Virology* 190: 794-805.

- Tian, P., Ball, J.M., Zeng, C.Q. and Estes, M.K. 1996. The Rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 possesses membrane destabilization activity. *J. Virol.* 70: 6973-6981.
- Tse, C.-M., Levine, S.A., Yun, C.H.C., Khurana, S. and Donowitz, M. 1994. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger-2 is an O-linked but not an N-linked sialoglycoprotein. *Biochemistry* 33: 12954-12961.
- Valenzuela, S., Pizarro, J., Sandino, A.M., Vásquez, M., Fernández, J., Hernández, O., Patton, J. and Spencer, E. 1991. Photoaffinity labeling of Rotavirus VP1 with 8-azido-ATP: identification of the viral RNA polymerase. *J. Virol.* 65(7): 3964-3967.
- Welch, S.-K., Crawford, S.E. and Estes, M.K. 1989. Rotavirus SA11 genome segment 11 protein is a nonstructural phosphoprotein. *J. Virol.* 63(9): 3974-3982.
- Xu, A., Bellami, A.R. and Taylor, J.A. 1998. BiP (GRP78) and Endoplasmic Reticulum (GRP94) are induced following Rotavirus infection and bind transiently to an endoplasmic reticulum-localized virion component. *J. Virol.* 72(12): 9865-9872.
- Yeh, T.-S., Lo, S.J., Chen, P.-J. and Lee, Y.-H. 1996. Casein kinase II and Protein kinase C modulate hepatitis delta virus RNA replication but not empty viral particle assembly. *J. Virol.* 70(9): 6190-6198.