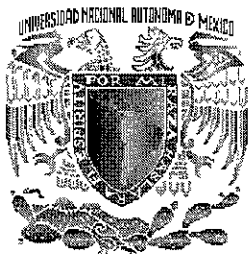
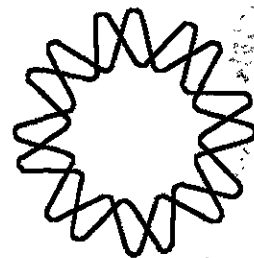


0059

Universidad Nacional Autónoma de México



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA



**ESTUDIO SOBRE LAS ASOCIACIONES
INTERMOLECULARES DE LA PROTEINA
NSP5 DE LOS ROTAVIRUS**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
B I O Q U I M I C A S
P R E S E N T A
BIOL. MIGUEL ANGEL TORRES VEGA

278-92

Cuernavaca, Mor.

2000



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias Bioquímicas.

Título: Estudio sobre las asociaciones intermoleculares de la proteína NSP5 de los rotavirus.

Estudiante: Biól. Miguel Angel Torres Vega

Resumen:

Los rotavirus, considerados como el principal agente de la diarrea en niños y animales jóvenes, están formados por tres capas concéntricas de proteína, que envuelven un genoma de 11 segmentos de RNA de doble cadena. El genoma codifica para seis proteínas estructurales y seis proteínas no estructurales. Entre éstas últimas está la NSP5, una fosfoproteína O-glicosilada que se encuentra en células infectadas como varias isoformas con Mr de 26, 28 y 30-34 kDa. La NSP5 se localiza en los viroplasmos y está asociada con partículas subvirales que funcionan como intermediarios en la replicación de los rotavirus. En este trabajo se caracterizaron las actividades catalíticas y las asociaciones intermoleculares de esta proteína. La proteína NSP5 nativa, así como producida por métodos recombinante, fueron aisladas por inmunoprecipitación, y se demostró que son capaces de fosforilar *in vitro*. Esta actividad también fosforiló caseína y fue inhibida hasta un 80% por el compuesto H7 a una concentración de 2×10^{-4} M. La fosforilación *in vitro* de NSP5 recombinante se aumentó dramáticamente por extractos de células epiteliales MA104. Por otra parte, se determinó que NSP5 forma multímeros e interacciona con la proteína no estructural NSP6, utilizando el sistema de los dos híbridos de levadura. También se mapearon los dominios de NSP5 que están involucrados en estas asociaciones. Para ello, se construyeron mutantes de delección de NSP5 que se ensayaron en su habilidad para interactuar con la NSP5 y la NSP6 silvestres por medio del sistema de los dos híbridos. El dominio de homomultimerización se localizó en los últimos 20 aminoácidos del extremo carboxilo, que es una región altamente conservada de la proteína, y por predicción tiene una estructura de α -hélice. El dominio de interacción con NSP6 abarca los 35

aminoácidos carboxi-terminales de NSP5, por lo cual se yuxtapone con el dominio de homomultimerización. La homo-oligomerización de NSP5 y la formación de complejos con NSP6 también se observó por medio de un ensayo de afinidad *in vitro*, y por inmunoprecipitación de los complejos de proteína utilizando un sistema de expresión transitorio y ensamblados en células MA104. El empleo de una mutante de NSP5 que carece de los últimos 10 aminoácidos de la proteína ($\Delta C10$), en los diferentes sistemas utilizados, permitió: i) verificar los dominios de homo-oligomerización e interacción con NSP6; ii) observar una correlación entre la homo-oligomerización de NSP5 y su capacidad de hiperfosforilación (isoformas de 30-34 kDa) y de formación de estructuras similares a viroplasma. Se propone que NSP5 es una proteína cinasa que se autofosforila, siendo su homo-oligomerización la que activa sus funciones en la replicación de los rotavirus, con NSP6 participando como uno de los reguladores.

CARLOS F. ARIAS O.

Dr. Carlos F. Arias Ortíz

Vo. Bo. del Tutor.

Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias Bioquímicas.

Título: Estudio sobre las asociaciones intermoleculares de la proteína NSP5 de los rotavirus.

Estudiante: Biól. Miguel Angel Torres Vega

Abstract:

Rotaviruses are the major aetiological agents of gastroenteritis in children and young animals. These viruses are formed by three concentric layers of proteins that enclose a genome of 11 segments of double-stranded (ds) RNA. The genome encodes six structural and six non-structural proteins. NSP5 is a non-structural o-glycosylated phosphoprotein, which exists as several isoforms with Mrs of 26, 28, 30-34 kDa. NSP5 localizes to viroplasm and it is a component of subviral particles that are intermediates in rotavirus replication. In this work a characterization of NSP5 catalytic activities and intermolecular associations was carried out. Isolated native and recombinant NSP5 proteins were shown to become phosphorylated in an in vitro assay. Casein was also phosphorylated by this activity, which was 80% inhibited by the H7 compound (2×10^{-4} M). In vitro NSP5 phosphorylation was strongly enhanced by MA104 cells extracts. On the other hand, the NSP5 multimerization and its interaction with NSP6 were identified by using the yeast two-hybrid system. To map the domains of NSP5 responsible for these associations, deletion mutants of this protein were constructed and assayed for their ability to interact with full-length NSP6 and NSP5 using the yeast two-hybrid assay. The homomultimerization domain was mapped to the 20 C-terminal amino acids of the protein, which is highly conserved and have a predicted α -helical structure. The interaction domain with NSP6 was found to be present in the 35 C-terminal amino acids of NSP5, overlapping the multimerization domain of the protein. The NSP5 multimerization and its interaction with NSP6 were confirmed using an in vitro affinity assay and by immunoprecipitation of the protein complexes transiently expressed in MA104 cells. With a

deletion mutant lacking the 10 C-terminal amino acids ($\Delta C10$) in the different systems used, it was possible to: i) check the homomultimerization and the interaction NSP6 domains; ii) observe a correlation between the multimerization of NSP5 and their capacity to form viroplasm-like structures and hyperphosphorylation isoforms (30-34 kDa). These results suggest that NSP5 has an autocatalytic kinase activity, that is activated by the multimerization of the protein, which is regulated by NSP6

CARLOS F. ARIAS O.

Dr. Carlos F. Arias Ortíz

Vo. Bo. del Tutor.

Este trabajo se realizó en el Departamento de Genética y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM, bajo la asesoría del **Dr. Carlos F. Arias O.** Se contó con el apoyo de CONACyT por medio de una beca de Doctorado.

Agradezco a los
Drs. Carlos Arias y Susana López
su apoyo infinito, su paciencia y
su invaluable dedicación en mi formación

Agradezco al
Dr. Alberto Darszon
su confianza y por haberme
introducido al pensamiento riguroso
en investigación

A mi madre y a mi hermano
por el apoyo incondicional, el cariño
y por mantenernos unidos siempre

A mis amigos:

Marco (Alma y Daniela)

Felipe (Paty y Alonso)

María Elena y Rosa Elena

Miguel A. Dector (Carmen y Axel) y Fernando Hdz.

Blanca y Daniel

Toño Velázquez

A mi "segunda familia":

Ernesto, Fernando Esquivel y Lulú, Rafa y Celso, Pedro y Pedro Jr., Luis Padilla, Mariela, Diana, Ramón y Carlos Arturo

A mis compañeros

Pavel, Tomás y Alba, Jimena, Rosalba, Martha, Pedro Gama, Selene y Vicky

A mis excompañeros y buenos amigos

Otilia, Dra. Carmen, Angelina, Nacho, Esmeralda, Carmen Judith, Carlos, José Luis, Claudia, Takuya, Doña Francis y Don Juan

y también a

Mónica y Gloria

INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCION	5
Los rotavirus como agentes de la diarrea.	6
Características del virión y del genoma de los rotavirus.	7
Ciclo de replicación.	12
A) Las primeras etapas en la infección: adsorción, penetración y desnudamiento.	14
B) Expresión del genoma.	15
C) Traducción de los mRNAs virales.	16
D) Replicación del genoma y morfogénesis del virión.	18
E) Formación del virión maduro y liberación de la célula.	24
Los productos del gene 11.	25
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	28
HIPOTESIS	30
OBJETIVOS	32
METODOS	34
RESULTADOS	37
I) Artículo aceptado en el <i>Journal of General Virology</i> “The C-terminal domain of rotavirus NSP5 is essential for its multimerization, hypherphosphorylation and interaction with NSP6.”	38
II) Resultados adicionales:	49
1. Actividad de cinasa asociada con NSP5 nativa <i>in vitro</i> .	49
2. Caracterización de la actividad de cinasa asociada con NSP5 <i>in vitro</i> .	51
3. Actividad de cinasa asociada con NSP5 recombinante <i>in vitro</i> .	54
4. Correlación entre la capacidad de multimerización e hiperfosforilación de NSP5 con la formación de pseudo-viroplasma.	57
DISCUSION	61
Asociaciones intermoleculares de NSP5.	62
Actividades catalíticas que inciden sobre la fosforilación de NSP5.	67
Regulación de la hiperfosforilación de NSP5 por asociaciones intermoleculares.	74
Multimerización/hiperfosforilación de NSP5 y el ensamblaje de los viroplasma.	77
Participación de NSP5 en los eventos moleculares que anteceden la replicación del genoma de los rotavirus y la morfogénesis del virión.	78
PERSPECTIVAS	80
REFERENCIAS	83

RESUMEN

Los rotavirus, considerados como el principal agente de la diarrea en niños y animales jóvenes, están formados por tres capas concéntricas de proteína, que envuelven un genoma de 11 segmentos de RNA de doble cadena. El genoma codifica para seis proteínas estructurales y seis proteínas no estructurales. Entre éstas últimas está la NSP5, una fosfoproteína O-glicosilada que se encuentra en células infectadas como varias isoformas con Mr de 26, 28 y 30-34 kDa. La NSP5 se localiza en los viroplasmos y está asociada con partículas subvirales que funcionan como intermediarios en la replicación de los rotavirus. En este trabajo se caracterizaron las actividades catalíticas y las asociaciones intermoleculares de esta proteína. La proteína NSP5 nativa, así como producida por métodos recombinante, fueron aisladas por inmunoprecipitación, y se demostró que son capaces de fosforilar *in vitro*. Esta actividad también fosforiló caseína y fue inhibida hasta un 80% por el compuesto H7 a una concentración de 2×10^{-4} M. La fosforilación *in vitro* de NSP5 recombinante se aumentó dramáticamente por extractos de células epiteliales MA104. Por otra parte, se determinó que NSP5 forma multímeros e interacciona con la proteína no estructural NSP6, utilizando el sistema de los dos híbridos de levadura. También se mapearon los dominios de NSP5 que están involucrados en estas asociaciones. Para ello, se construyeron mutantes de delección de NSP5 que se ensayaron en su habilidad para interactuar con la NSP5 y la NSP6 silvestres por medio del sistema de los dos híbridos. El dominio de homomultimerización se localizó en los últimos 20 aminoácidos del extremo carboxilo, que es una región altamente conservada de la proteína, y por predicción tiene una estructura de α -hélice. El dominio de interacción con NSP6 abarca los 35 aminoácidos carboxi-terminales de NSP5, por lo cual se yuxtapone con el dominio de homomultimerización. La homo-oligomerización de NSP5 y la formación de complejos con NSP6 también se observó por medio de un ensayo de afinidad *in vitro*, y por inmunoprecipitación de los complejos de proteína utilizando un sistema de expresión

transitorio y ensamblados en células MA104. El empleo de una mutante de NSP5 que carece de los últimos 10 aminoácidos de la proteína ($\Delta C10$), en los diferentes sistemas utilizados, permitió: i) verificar los dominios de homo-oligomerización e interacción con NSP6; ii) observar una correlación entre la homo-oligomerización de NSP5 y su capacidad de hiperfosforilación (isoformas de 30-34 kDa) y de formación de estructuras similares a viroplasmos. Se propone que NSP5 es una proteína cinasa que se autofosforila, siendo su homo-oligomerización la que activa sus funciones en la replicación de los rotavirus, con NSP6 participando como uno de los reguladores.

ABSTRACT

Rotaviruses are the major aetiological agents of gastroenteritis in children and young animals. These viruses are formed by three concentric layers of proteins that enclose a genome of 11 segments of double-stranded (ds) RNA. The genome encodes six structural and six non-structural proteins. NSP5 is a non-structural o-glycosylated phosphoprotein, which exists as several isoforms with Mrs of 26, 28, 30-34 kDa. NSP5 localizes to viroplasm and it is a component of subviral particles that are intermediates in rotavirus replication. In this work a characterization of NSP5 catalytic activities and intermolecular associations was carried out. Isolated native and recombinant NSP5 proteins were shown to become phosphorylated in an *in vitro* assay. Casein was also phosphorylated by this activity, which was 80% inhibited by the H7 compound (2×10^{-4} M). *In vitro* NSP5 phosphorylation was strongly enhanced by MA104 cells extracts. On the other hand, the NSP5 multimerization and its interaction with NSP6 were identified by using the yeast two-hybrid system. To map the domains of NSP5 responsible for these associations, deletion mutants of this protein were constructed and assayed for their ability to interact with full-length NSP6 and NSP5 using the yeast two-hybrid assay. The homomultimerization domain was mapped to the 20 C-terminal amino acids of the protein, which is highly conserved and have a predicted α -helical structure. The interaction domain with NSP6 was found to be present in the 35 C-terminal amino acids of NSP5, overlapping the multimerization domain of the protein. The NSP5 multimerization and its interaction with NSP6 were confirmed using an *in vitro* affinity assay and by immunoprecipitation of the protein complexes transiently expressed in MA104 cells. With a deletion mutant lacking the 10 C-terminal amino acids (Δ C10) in the different systems used, it was possible to: i) check the homomultimerization and the interaction NSP6 domains; ii) observe a correlation between the multimerization of NSP5 and their capacity to form viroplasm-like structures and hyperphosphorylation isoforms (30-34 kDa). These

results suggest that NSP5 has an autocatalytic kinase activity, that is activated by the multimerization of the protein, which is regulated by NSP6

INTRODUCCION

Los rotavirus como agentes de la diarrea.

Los rotavirus, miembros de la familia *Reoviridae*, son el principal agente etiológico de la diarrea en niños y en animales jóvenes. Se ha estimado que estos virus ocasionan un 40 % de las diarreas severas en todo el mundo, lo cual repercute en 870 mil muertes anuales por deshidratación de niños menores de cinco años (aproximadamente 6% de las muertes totales). La mortalidad por rotavirus se concentra en los países en desarrollo (Fields, 1996; Kapikian y Chanock, 1996; Jacobson, 1999).

Los rotavirus son transmitidos por la ruta fecal-oral. Estos virus exhiben tropismo por las células epiteliales absortivas de las vellosidades del intestino delgado, en donde se replican y producen citólisis. Esta destrucción parcial de las vellosidades disminuye significativamente la retención de fluido y desencadena la diarrea (Desselberger, 1998). Además, se ha determinado que en la inducción de la diarrea por rotavirus está involucrado el sistema nervioso presente en la pared del intestino (sistema nervioso entérico). Durante la infección los rotavirus promueven la activación de las células nerviosas entéricas, las cuales estimulan a las células epiteliales de las vellosidades a incrementar su secreción de Cl⁻ y agua. Este mecanismo es responsable de aproximadamente el 60% de la diarrea (Lundgren *et al.*, 2000). La activación de las células nerviosas entéricas puede ser mediada por la inflamación del intestino o por un componente de los rotavirus, tal como la proteína NSP4, a la cual se le ha atribuido el papel de una enterotoxina (Ball *et al.*, 1996). La terapia de la diarrea se basa en el remplazo del fluido perdido con una solución oral de glucosa y sal (Desselberger, 1998). Un avance significativo en el tratamiento de esta enfermedad será la utilización de drogas que inhiban la liberación de neurotransmisores de las células nerviosas entéricas y, como consecuencia, disminuyan la secreción del fluido intestinal.

Para auxiliar en la protección de la diarrea causada por los rotavirus se desarrolló una vacuna (RotaShield) con componentes de los cuatro serotipos patogénicos predominantes en humanos

vacuna tetravalente). Cuando la vacuna se administró oralmente se alcanzó un 69-88% de protección de la diarrea severa incluyendo deshidratación (Kapikian y Chanock, 1996; Jacobson, 1999). Sin embargo, resultados preliminares sugieren una correlación entre la administración de la vacuna y el desarrollo de intususcepción (un tipo de obstrucción del intestino que ocurre cuando éste se pliega sobre si mismo). Actualmente se han reportado 23 casos de intususcepción en niños inmunizados con RotaShield (de un total de 1.5 millones de dosis). Por lo tanto, mientras se realizan estudios adicionales sobre los efectos secundarios posibles de esta vacuna, se ha suspendido su aplicación (Abramson *et al.*, 1999; Gay *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 1999b).

Características del virión y del genoma de los rotavirus.

Los rotavirus se distinguen por tener tres capas concéntricas de proteína con geometría icosaédrica, que envuelven un genoma de RNA de doble cadena (dsRNA) dividido en 11 segmentos (Prasad y Chiu, 1994; Prasad y Estes, 1997). El genoma codifica para doce proteínas: seis estructurales y seis no-estructurales (Tabla 1). Las proteínas estructurales integran un virión de 100 nm de la siguiente manera (Figura 1): la cubierta externa, con simetría $T = 13$, está formada por 260 trímeros de la glicoproteína VP7, y por 60 dímeros de la hemaglutinina viral VP4; ésta última se proyecta de la superficie del virus como espigas de 10-12 nm. La capa intermedia, con simetría $T = 13$, es ensamblada por 260 trímeros de la proteína VP6; y la pared de la nucleocápside o “core”, con $T = 1$, está constituida por 60 dímeros de la proteína VP2. La cubierta está perforada por canales que atraviesan en registro las tres capas concéntricas de proteína; se cree que sirven para la entrada de los metabolitos necesarios en la transcripción, así como para la salida de los mRNAs recién sintetizados (Lawton *et al.*, 1997).

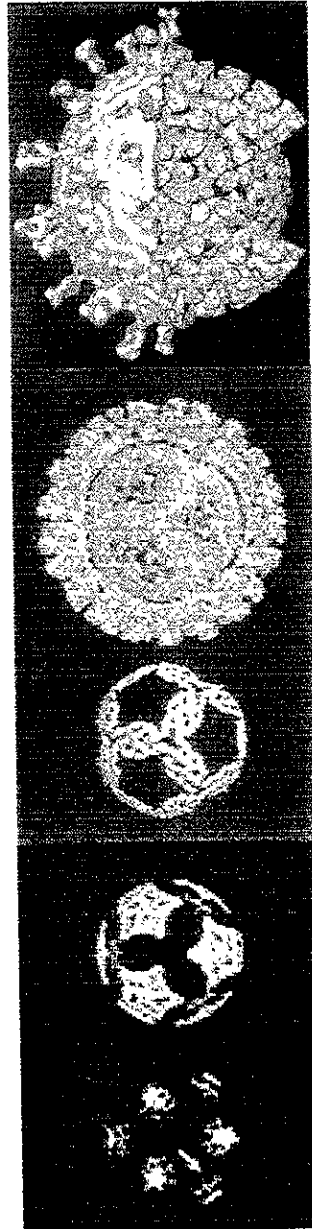


Figura 1. Estructura de los rotavirus. La cubierta del viri3n se compone de tres capas conc3ntricas de prote3nas: VP4 y VP7 se ensamblan para formar la superficie externa (de color amarillo en A), VP6 constituye la capa intermedia (de color azul en A y B), y VP2 forma la pared de la nucleoc3pside (de color gris en A, B y D). Adem3s VP2 se invagina para dar origen a estructuras pentam3ricas (D), entre las cuales se forman hendiduras que albergan un genoma de RNA ordenado, que representa hasta un 25% del total (C). Dentro de la nucleoc3pside existen complejos de la polimerasa viral VP1 y la guanililtransferasa VP3 (se3alados por una flecha en E), que se localizan enfrente de los pent3meros de VP2 (D) (Modificado de Prasad *et al.*, 1996; Prasad y Estes, 1997).

Tabla 1. Características y asignamiento a los segmentos de dsRNA de las proteínas de los rotavirus.

<i>segni.</i>	<i>pare base s</i>	<i>proteín a (aa)</i>	<i>Mr kDa</i>	<i>modificaciones postraduccionales</i>	<i>agregados mol. básicos</i>	<i>distribución celular</i>	<i>dominios estructurales (aa)</i>	<i>propiedades/función</i>
1	3302	VP1 (1088)	125			viroplasma		RNA polimerasa, unión al 3' UTR de los mRNAs
2	2690	VP2 (881)	94		dímeros	viroplasma	unión a RNA (1-132)	pared del core, une ssRNA, cofactor de VP1
3	2591	VP3 (835)	88			viroplasma		guanililtransferasa, une ssRNA
4	2362	VP4 (776)	88	corte en aa 231, 241 ó princ. 247 produce: VP8 (28 kDa) VP5 (60 kDa)	dímeros	asociada al RE	unión a ac. siálico (VP8: Tyr-155, Tyr-188, Ser-190), unión a receptor asialo (VP5), unión a integrinas (DGE, 307-309)	espigas de capa externa (serotipos P), tropismo, hemaglutinación, unión de receptor, penetración
5	1581	NSP1 (491)	53			citoplasma	unión a RNA (dedo de zinc, 53-87)	unión al 5' UTR de los mRNAs, asociada al citoesqueleto, canalización de los mRNAs hacia replicación?
6	1356	VP6 (397)	41	miristilación	trímeros	viroplasma	trimerización (246-314), interac. con VP2 (23-43, 60-72), interac. con VP4 (52-57, 202-203, 255-275, 283, 293-295, 351-359), interac. con VP7 (168-174, 199-200, 298-315)	capa intermedia (grupos A-E), esencial en transcripción

Tabla 1. Características y asignamiento a los segmentos de dsRNA de las proteínas de los rotavirus (contin.)

<i>segm.</i>	<i>pare base s</i>	<i>proteín a (aa)</i>	<i>M_r kDa</i>	<i>modificaciones postraduccionales</i>	<i>agregados mol. básicos</i>	<i>distribución celular</i>	<i>dominios estructurales (aa)</i>	<i>propiedades/función</i>
7	1104	NSP3 (315)	34		dímeros	citoplasma	unión a RNA (4-149), dimerización (150-206), unión a eIF4GI (208-315)	unión al 3' UTR (GACC) de los mRNAs, interacción con eIF4GI, asociada al citoesqueleto, promueve la síntesis de las proteínas virales y el "shut off" de las proteínas celulares
8	1059	NSP2 (317)	35	fosforilación	multímeros 10S, que aumentan en tamaño al unir RNA	viroplasma		une >> ss y << dsRNA, complejo con VP1 y NSP5, ensamblaje de viroplasmos, estimula hiperfosforilación de NSP5, NTPasa, empaquetamiento de RNAs?
9	1062	VP7 (326)	38	corte de péptido señal en aa 51, N-glicosilación (oligosacáridos de manosa) y "trimming"	trímeros	RE	retención en RE (LPITGS, 57-63)	capa externa (serotipo G), altera la conformación de VP4, bloquea la translocación de los mRNAs y la transcripción
10	751	NSP4 (175)	28	N-glicosilación (oligosacáridos de manosa) y "trimming"		RE	interac. con VP4 (112-146), interac. con VP6 (161-175)	receptor de DLPs, enterotoxina
11	667	NSP5 (198)	26, 28, 30-34	O-glicosilación (N-acetilglucosamina), fosforilación en Ser y Thr	oligómeros	viroplasma	oligomerización (187-197), interac. con NSP2 (1-31), interac. con NSP6 (163-197)	complejo con NSP2 y NSP6, ensamblaje de viroplasmos, actividad de cinasa?
		NSP6 (92)	11			viroplasma		complejo con NSP5

La longitud de los segmentos de dsRNA, la correspondencia con las proteínas que codifican, el tamaño en aa y el M_r están en función de la cepa SA11.
RE = retículo endoplásmico.

La organización interna de la nucleocápside se determinó por medio del análisis de partículas de doble capa (DLPs, viriones que carecen de VP4 y VP7) y partículas virales recombinantes expresadas en baculovirus (VLPs), usando criomicroscopía electrónica (Prasad *et al.*, 1996). Además de identificar a VP2 en un radio de 235 a 260 nm como una cubierta lisa, se observó que esta proteína invade el interior de la nucleocápside en los ejes con simetría de cinco del icosaedro, formando una estructura pentagonal (Figura 1D). En la punta de los pentágonos se localizan los complejos de las proteínas VP1 y VP3, con un aspecto de flores (Figura 1E). El espacio lateral entre los pentágonos de VP2 está ocupado por el genoma, que se organiza como hebras paralelas formando una capa dodecahédrica (Figura 1C).

Casi todos los segmentos del genoma de los rotavirus codifican para una proteína con excepción del segmento 11, que lo hace para dos (Tabla 1). Los segmentos de dsRNA se caracterizan por tener marcos de lectura abiertos (ORFs) flanqueados por secuencias no codificadoras (UTRs, Figura 2). Las hebras positivas (5'→3') de cada segmento de dsRNA, al igual que los mRNA virales, exhiben una estructura de cap ($m^7GpppG^{(m)}GPy$) en el extremo 5' y no están poliadeniladas en el extremo 3' (Patton, 1995).

Los UTRs varían en longitud, siendo de 9 a 49 pb en el extremo 5', y de 17 a 182 pb en el extremo 3' (Figura 2). No obstante en los UTRs se localizan secuencias que están conservadas en todos los segmentos de los genomas de los rotavirus. En los RNAs de los rotavirus del grupo A la secuencia consenso en el UTR-5' es 5' G-G-C-A/U-A/U-U-A/U-A-A/U-A/U 3' y en el UTR-3' es 5' A/U-U-G/U-U/G-G/U-A/G-C-C 3'. Además, los UTR-5' y 3' completos de genes homólogos de diferentes cepas están muy conservados. La función de los UTRs probablemente es la de unir proteínas que participan en el empaquetamiento y en la síntesis de los RNAs, así como en la traducción de los mRNAs (Desselberger y McCrae, 1994; Patton, 1995).



Figura 2. Organización de los segmentos de dsRNA de los rotavirus. Cada uno de los segmentos del genoma está formado por un marco de lectura abierto (ORF) y dos secuencias no codificadoras (UTR). En los UTRs se localizan secuencias que están conservadas en todos los segmentos de los rotavirus del grupo A; las secuencias consenso son indicadas (Tomado de Patton, 1995).

Ciclo de replicación.

Los rotavirus llevan a cabo su ciclo de replicación en el citoplasma de las células que infectan (Figura 3). Después de la unión del receptor, los rotavirus penetran a la célula y pierden la capa externa, con lo cual se activa la transcripción. Los RNAs de polaridad positiva (5'→3') que son sintetizados cumplen dos funciones: como mRNAs en la traducción de las proteínas, y como planteados para la síntesis de los RNAs negativos (3'→5') durante la replicación del genoma. La selección, el empaquetamiento, y la replicación de los segmentos del genoma, así como la morfogénesis del virión, se llevan a cabo en unas estructuras electrodensas denominadas viroplasmos, que están compuestas de RNA y de proteínas virales. Una vez formadas, las DLPs abandonan el viroplasma y adquieren la capa externa al gemar a través de la membrana del retículo endoplásmico (RE) modificada por proteínas virales. Durante el proceso de gemación los virus son envueltos por una membrana transitoria. Los viriones maduros son liberados de la célula por lisis (Estes y Cohen, 1989; Mattion *et al.*, 1994; Estes, 1996).

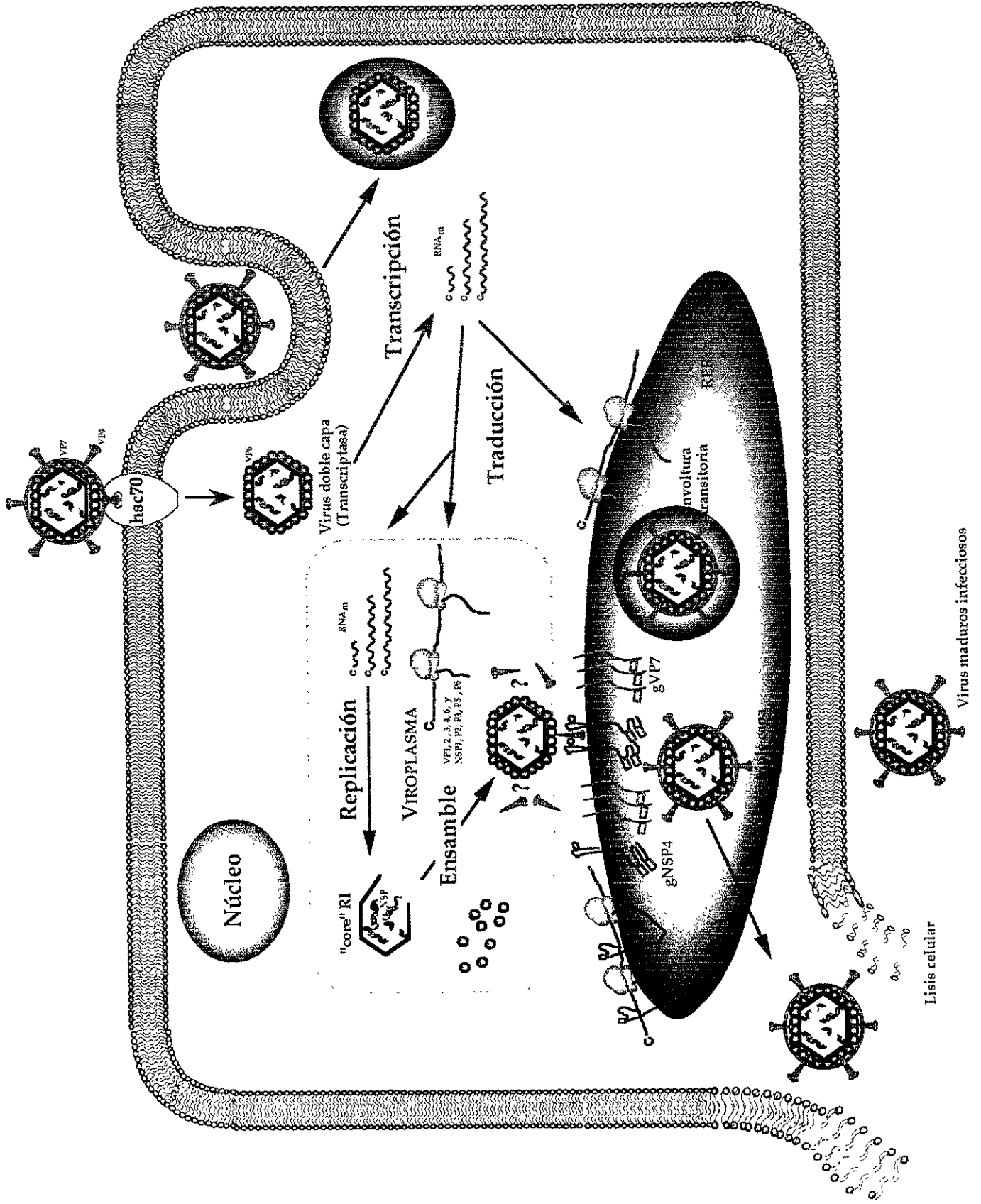


Figura 3. Principales características del ciclo de replicación de los rotavirus (Modificado de Estes, 1996).

A) Las primeras etapas en la infección: adsorción, penetración y desnudamiento.

El proceso de infección de los rotavirus inicia con el reconocimiento de un receptor celular. Se ha identificado por medio de competencias entre rotavirus de diferentes orígenes que en la unión del receptor existen dos interacciones: una inespecífica, mediada por ácido siálico, y otra específica en la que podrían estar involucradas dos o más moléculas de la superficie celular (Estes y Cohen, 1989; Méndez *et al.*, 1996; E. Méndez, comunicación personal). Las proteínas celulares que aparentemente participan en la interacción específica son las integrinas $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_x\beta_2$, $\alpha_v\beta_3$, así como la proteína de choque térmico hsc70 (Guerrero *et al.*, 2000a, b y c). Estas proteínas pueden estar formando parte de un complejo en la membrana con el cual interacciona el virus.

La proteína viral involucrada en la unión con el receptor es VP4. Esta proteína tiene la secuencia consenso de unión a integrinas (DGE), y es considerada como la hemaglutinina viral (Tabla 1). VP4 es procesada específicamente por tripsina para dar origen a dos péptidos: VP5 y VP8; la generación de estos péptidos es esencial para que se lleve a cabo la penetración (Arias *et al.*, 1996). Recientemente se ha identificado a VP5 como la proteína responsable de llevar a cabo la unión específica con el receptor (Zárate *et al.*, 2000), aunque no existen datos directos de interacción entre VP5 y alguna de las proteínas celulares candidatas. La otra proteína de la cubierta externa, VP7, puede modular la estructura de VP4 y en consecuencia, participa indirectamente en las primeras interacciones del virus con la célula (Mendez *et al.*, 1996).

Los rotavirus ingresan a la célula aparentemente por penetración directa. Durante este proceso el virus pierde la capa externa de proteínas, fenómeno que se denomina desnudamiento. A partir de estudios *in vitro* se propuso que el bajo nivel de calcio intracelular [Ca^{2+}] podría desestabilizar la cubierta externa del virión, lo que conduciría a su desnudamiento (Cohen *et al.*, 1979; Ludert *et al.*, 1987). Sin embargo, los resultados

preliminares de la manipulación de los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ en células MA104 infectadas con rotavirus sugieren que esta hipótesis probablemente no es correcta (Cuadras *et al.*, 1997).

B) Expresión del genoma.

La transcripción del genoma de los rotavirus es activada al removerse la cubierta externa del virión. La síntesis de los mRNAs tiene lugar dentro de las DLPs, por medio de la acción concertada de la transcriptasa viral VP1 y la guanililtransferasa VP3. La traslocación de los mRNAs se efectúa a través de los canales de tipo I, que están localizados en los ejes con simetría de 5 del icosaedro (Estes, 1996; Lawton *et al.*, 1997). Aunque aparentemente no presenta ninguna actividad enzimática, la proteína de la cubierta intermedia VP6 es esencial para que se lleve a cabo la síntesis de los mRNAs (Sandino *et al.*, 1986).

Se ha propuesto que el desnudamiento del virión es necesario en la activación de la transcripción debido a que VP7 puede obstruir la salida de los mRNAs a través de los canales de tipo I. La comparación de las estructuras tridimensionales definidas por criomicroscopía electrónica entre DLPs y partículas virales completas (TLPs), a una resolución de 21 Å, permitió determinar que VP7 se organiza de tal manera que reduce la apertura del poro tipo I a aproximadamente un 50% de la que exhibe en la envoltura de VP6. Lawton y colaboradores (1999) también resolvieron la estructura de DLPs unidas por fragmentos Fab del anticuerpo monoclonal (mab) 2A11/E9, cuyo epítotope está sobre la superficie exterior de VP6. Estos complejos son transcripcionalmente inactivos y su estructura muestra una disminución en la apertura del poro tipo I, similar a la que ocurre en las TLPs. De estos complejos DLP-mAb y de las TLPs se han aislado mRNAs, que en su gran mayoría son pequeños (hasta de 7 bases). Estos resultados sugieren que en los viriones completos no existe una inhibición del inicio de la transcripción, y que la capa

externa constituye una barrera para la salida de los mRNAs de la nucleocápside. En los rotavirus la transcripción parece estar acoplada a la translocación de los mRNAs, de tal modo que si se impide la salida de los mRNAs de la nucleocápside (por ejemplo, por VP7), la elongación de los transcritos se detiene. El desnudamiento de los viriones para formar las DLPs reactivaría la transcripción a nivel de elongación.

C) Traducción de los mRNAs virales.

La traducción de los mRNAs de los rotavirus se lleva a cabo en los polisomas libres y unidos al RE. Un aspecto particular de la infección por rotavirus consiste en que a medida que se traducen los mRNAs virales ocurre una inhibición de la síntesis de las proteínas celulares. Este fenómeno es conocido como “shut off” (Estes y Cohen, 1989).

Los mRNAs de los rotavirus se caracterizan por tener una estructura de “cap” en el extremo 5’ y no estar poliadenilados en el extremo 3’ (Patton, 1995). Estos mRNAs adquieren el “cap” a través de la actividad de guanililtransferasa de la proteína viral VP3 (Tabla 1). Esta proteína une covalente y reversiblemente GTP, usando como cofactor al Mn^{2+} (Liu *et al.*, 1992; Patton y Chen, 1999).

Otra característica de los mRNAs de los rotavirus es que pueden unir a la proteína no-estructural NSP3 (Tabla 1, Poncet *et al.*, 1993, 1994). En los mRNAs de los rotavirus del grupo A, NSP3 reconoce estrictamente la secuencia GACC de la región conservada del UTR-3’ (Poncet *et al.*, 1994). Utilizando el sistema de los dos híbridos se determinó que NSP3, por otra parte, interacciona específicamente con el factor de inicio de la traducción 4GI (eIF4GI), y de este modo favorece la traducción de los mRNAs virales. eIF4GI junto con eIF4A y eIF4E constituyen el factor eIF4F, que es esencial en la síntesis de las proteínas celulares. Durante este proceso el factor eIF4GI (en el complejo eIF4F) se asocia con la proteína e unión a la cola poly(A) (PABP), con lo cual se promueve a traducción

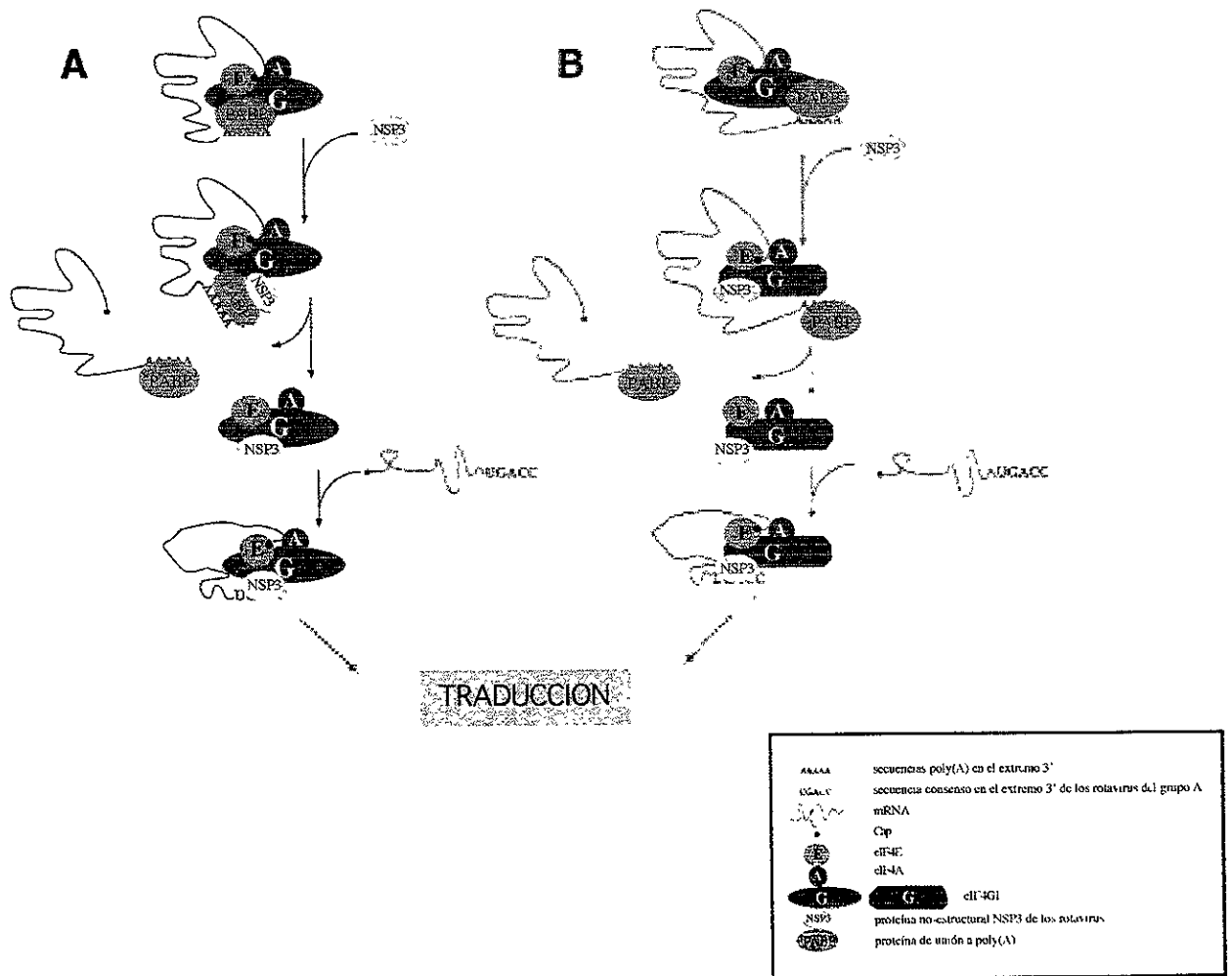


Figura 4. NSP3 promueve la síntesis de las proteínas de los rotavirus y el “shutoff” de las proteínas celulares. NSP3 desplaza a PABP de su unión con eIF4F (complejo de eIF4E, eIF4A y eIF4G1), ya sea porque compite con PABP por el sitio de unión a eIF4G1 (A), o porque al interactuar con eIF4G1 produce un cambio conformacional en este factor que libera a PABP (B). Este mecanismo disminuye la síntesis de las proteínas celulares (“shut off”). En cambio, NSP3 unido a eIF4F puede asociarse a los mRNAs virales por su extremo 3’, favoreciendo su traducción. Note que el mRNA viral se une a eIF4F por sus dos extremos, formando un “loop” (Tomado de Piron *et al.*, 1998).

de los mRNAs eucarióticos (Jacobson, 1996). Sin embargo, NSP3 al unirse a eIF4GI puede desplazar selectivamente a PABP de eIF4F *in vivo*, con lo cual interfiere en la traducción de los mRNAs celulares, dando origen al “shut off”. Alternativamente, NSP3 por medio de su unión simultánea con el factor eIF4F y con el extremo 3' de los mRNAs virales, puede promover la síntesis de las proteínas de los rotavirus (Figura 4; Pirón *et al.*, 1998).

Por consiguiente, el modelo que se propone para el inicio de la traducción de los mRNAs de los rotavirus es el denominado de “loop” cerrado. En este modelo se establece que los extremos 5' y 3' de los mRNAs estarían unidos a eIF4F por medio de la asociación de su cap a eIF4E, y de su secuencia GACC en el UTR-3' al complejo NSP3-eIF4GI, mientras que la porción restante de la molécula de mRNA formaría una ojiva (Jacobson, 1996; Piron *et al.*, 1998, 1999).

D) Replicación del genoma y morfogénesis del virión.

La replicación del genoma de los rotavirus es conservativa: las hebras de RNA de polaridad positiva (5'→3') se producen a partir de la transcripción de los segmentos del RNA genómico en las DLPs. Posteriormente, estas hebras son utilizadas como el molde para la generación de los RNAs negativos (3'→5'), que se mantienen unidos al RNA positivo (5'→3') constituyendo así los dsRNAs de la progenie (Patton, 1995; Estes, 1996).

Se ha propuesto que la síntesis de los RNAs negativos (3'→5') se lleva a cabo de manera coordinada con la selección y el empaquetamiento de los moldes de mRNA, en partículas subvirales formadas *de novo*. Este modelo se basa en tres observaciones: i.) no se han identificado dsRNAs libres en las células infectadas; ii.) en nucleocápsides aisladas,

que presentan RNAs asociados, los mRNAs fueron susceptibles a la degradación con RNAsas exógenas; iii.) en ensayos de replicasa *in vitro* las nucleocápsides experimentan una continua disminución de tamaño una vez que el dsRNA inicia su síntesis. Estos resultados sugieren que los RNAs templado están originalmente asociados a las partículas subvirales por la parte externa, y subsecuentemente son introducidos a la nucleocápside, proceso durante el cual probablemente se lleva a cabo la replicación (Patton y Gallegos, 1988, 1990).

Se han identificado tres clases de partículas subvirales con actividad de replicasa, que en conjunto se han denominado intermediarios de replicación (RIs). Los diferentes RIs, que fueron aislados a partir de lisados de células infectadas usando electroforesis no desnaturalizante en geles de agarosa, son los siguientes: el “precore” RI, con un diámetro de 45 nm, compuesto principalmente por las proteínas VP1, VP3, NSP1 y NSP3; el “core” RI, de 60 nm de diámetro, en donde las proteínas más abundantes son VP1, VP2, VP3, NSP2 y NSP5; y el VP6 RI, de 75 nm de diámetro, que está enriquecido con las proteínas VP1, VP2, VP3 y VP6. Debido a que los componentes principales de los RIs colocalizan en el viroplasma, se cree que es en esta estructura donde se efectúa la replicación (Gallegos y Patton, 1989; Patton, 1995).

Un hallazgo que refuerza la idea de que la replicación del genoma de los rotavirus *in vivo* se lleva a cabo a través de los RIs, fue el aislamiento de un tipo de partícula subviral con actividad de replicasa (que pudiera relacionarse con el VP6 RI) por medio de la inmunoprecipitación de lisados de células infectadas con rotavirus usando un anticuerpo monoclonal anti-NSP2. Esta partícula subviral estuvo compuesta por las proteínas VP1, VP2, VP6 y NSP2 (Aponete *et al.*, 1996).

A través de experimentos de pulso y caza de los RIs, se determinó que aparentemente la replicación del genoma se lleva a cabo simultáneamente con la morfogénesis del virión (Gallegos y Patton, 1989). En este sentido, se propuso como el centro de nucleación de los RIs al complejo de las proteínas NSP1 y NSP3 unidas a los extremos 5' y 3' de los

mRNAs, respectivamente. La función de NSP1, una proteína con dedos de zinc, podría consistir en comprometer los RNAs positivos (5'→3') hacia la vía de replicación (en contraste con la de traducción), y en unión con NSP3, y de acuerdo con su anclaje al citoesqueleto, llevar a cabo el transporte de estos RNAs hacia el viroplasma (Hua *et al.*, 1994; Hua y Patton, 1994; Patton, 1995). La incorporación de VP1 y VP3 a este complejo primario de RNA-proteína resultaría en el “precore” RI, que mediante la adición de VP2, NSP2 y NSP5 junto con la pérdida de NSP1 y NSP3, derivaría en el “core” RI; el “core” RI a través de la inclusión de VP6 y la eliminación de las proteínas no-estructurales, se transformaría en el VP6 RI (Gallegos y Patton, 1989, Patton, 1995).

En las partículas de replicasa caracterizadas por los grupos de Patton y Cohen esté presente la proteína no-estructural NSP2 (Tabla 1). Esta proteína multimeriza y une preferentemente ssRNA, interacciona con VP1 y NSP5, y tiene una actividad de nucleósido trifosfatasa (NTPasa) a través de la cual se autofosforila *in vitro* e *in vivo* (Kattoura *et al.*, 1992, 1994; Taraporewala *et al.*, 1999). Cuando un virus con una mutación termosensible en el gene de NSP2 (*tsE*) fue cultivado a la temperatura no permisiva, formó pocos viroplasmas y produjo partículas subvirales vacías y sin actividad de replicasa (Ramig y Petrie, 1984; Chen *et al.*, 1990). Además, NSP2 puede formar estructuras similares a viroplasmas en un sistema transitorio cuando es coexpresada con NSP5 (Fabbretti *et al.*, 1999). Estas características han permitido suponer que NSP2 tiene un papel esencial en la replicación del RNA. Se ha propuesto que NSP2, por medio de su actividad de NTPasa, podría obtener la energía necesaria para funcionar como un motor molecular, facilitando el empaquetamiento de los RNAs templado en las partículas subvirales, que entonces llevarían a cabo la polimerización de la hebra negativa (3'→5'; Taraporewala *et al.*, 1999).

Otra característica en común de los RIs aislados es que solamente pueden completar hebras de RNA negativas endógenas (3'→5', que vienen asociadas a los RIs), pero no inician la replicación de mRNAs añadidos exógenamente. Un sistema que sí replica

mRNAs exógenos *in vitro*, establecido por Chen *et al.* (1994), se denominó de “nucleocápsides abiertas”. Este sistema consiste en la obtención de nucleocápsides de células infectadas con rotavirus o a través de la expresión y el ensamblaje *in vivo* de los componentes de la nucleocápside (VP1, VP2 y VP3) en células de insecto infectadas con baculovirus recombinantes. Las nucleocápsides son inducidos a ‘abrirse’ cuando son puestas a dializar en un amortiguador de baja fuerza iónica. Las “nucleocápsides abiertas” inician y completan la síntesis de RNAs negativos (3'→5'), utilizando como templado mRNAs de rotavirus nativos o transcritos *in vitro*, siempre que conserven los extremos 5' y 3' *bona fide*. Utilizando este sistema se identificó una señal en *cis*, en los 26 nucleótidos (nt) 3'-terminales de los mRNAs, que es esencial en la replicación. Una conclusión significativa de este trabajo es que no es necesario el empaquetamiento en grupo de los 11 mRNAs para que se lleve a cabo la actividad de replicasa *in vitro*. También es interesante que la actividad de replicasa en las “nucleocápsides abiertas” recombinantes fue independiente de proteínas no-estructurales, que normalmente acompañan a los RIs aislados de células infectadas con rotavirus. Sin embargo, estas “nucleocápsides abiertas” no sintetizaron los diferentes segmentos de dsRNA en forma equimolar, lo que sí ocurre con los RIs, por lo que las proteínas no-estructurales podrían intervenir en esta actividad.

Las señales en *cis* que regulan la replicación del genoma de los rotavirus se mapearon con detalle usando mutantes de delección de mRNAs de rotavirus, y quimeras entre secuencias de los segmentos virales con secuencias irrelevantes, siendo examinadas por medio de “nucleocápsides abiertas”. Se identificaron tres señales importantes: un promotor mínimo, constituido por los últimos siete nucleótidos del UTR-3', cuya secuencia es 5'-UGUGACC-3'; y dos secuencias que estimulan la replicación (enhancer), una en los primeros 28 nucleótidos del UTR-5' y otra en una región de 27 nucleótidos inmediatamente río arriba del promotor mínimo (Wentz *et al.*, 1996). El promotor mínimo y el enhancer en el UTR-5' se localizan entre las secuencias conservadas en todos los segmentos de mRNA de los rotavirus del grupo A.

VP1 es la proteína que se une específicamente al extremo 3' de los mRNAs, presumiblemente al promotor mínimo (Patton, 1996). En VP1 se han identificado regiones con homología a las secuencias consenso de algunas RNA polimerasas virales dependientes de RNA, y esta proteína puede entrecruzar al análogo de nucleótidos [α - 32 P]azido-ATP, por lo que se ha considerado como la RNA polimerasa viral (Cohen *et al.*, 1989; Valenzuela *et al.*, 1991). La actividad de replicasa es dependiente de VP1, sin embargo, esta proteína sola no sintetiza RNAs negativos (3'→5'). Para la replicación del RNA es necesaria la proteína VP2, pero no VP3, la otra proteína de la nucleocápside (Patton, 1996; Patton, *et al.*, 1997). Se ha estimado que la relación de VP1 a VP2 con mayor actividad de replicasa *in vitro* es de 1:11, que es muy parecida a la tasa de estas proteínas en el virión (1:10). VP2 no es necesaria como iniciador (“primer”) de la replicación; la función de VP2 en este proceso aparentemente radica en su habilidad para unir mRNAs, ya que una mutante de VP2 en la que se eliminaron los 26 aa del dominio de interacción con RNA no pudo apoyar la replicación en las “nucleocápsides abiertas” (Labbe *et al.*, 1994; Mattion *et al.*, 1992; Patton *et al.*, 1997).

La interacción específica de VP1 al extremo 3' de los mRNAs no es suficiente para que se lleve a cabo la síntesis de la hebra de RNA negativa (3'→5'). A partir de la localización de las señales que actúan en *cis* para promover la replicación, y de la predicción de la estructura secundaria de los mRNA de los rotavirus, se ha propuesto que las regiones complementarias dentro de las secuencias conservadas en los extremos 5' y 3' del RNA deben de asociarse para formar una estructura de tipo “panhandle”, que funciona como el promotor básico en la replicación del mRNA (Chen y Patton, 1998). Las características más relevantes de esta estructura son las siguientes (Figura 5): a) los 12 nucleótidos (nt) 3'-terminales, que incluyen al promotor mínimo, no forman un dúplex; b) la región no traducida (UTR) en el extremo 5', donde se localiza uno de los “enhancers”, se pliega para

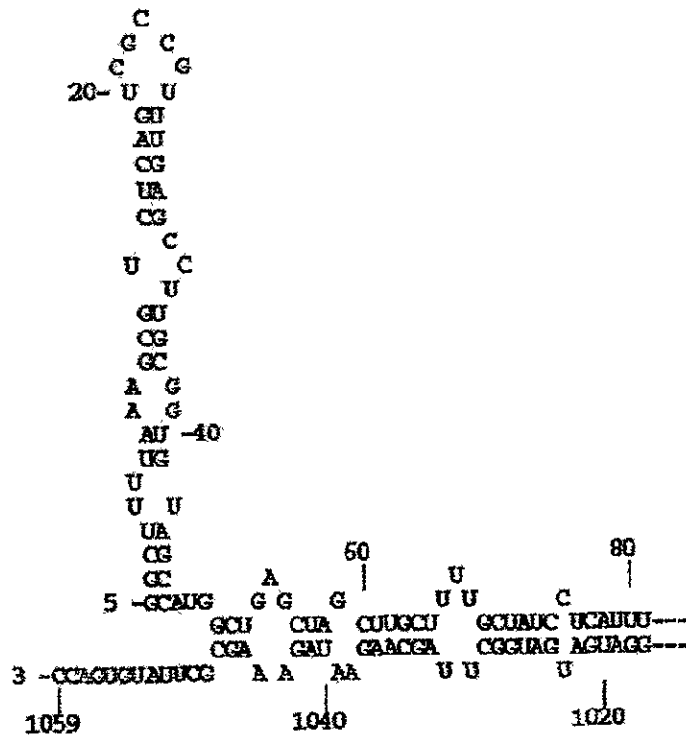


Figura 5. Estructura secundaria del promotor básico en la replicación de los mRNAs de los rotavirus. El mRNA del gene 8 del rotavirus SA11 se pliega de tal modo que los extremos 5' y 3' se unen para formar una estructura de "panhandle". Note que los 12 nt 3'-terminales están como cadena sencilla; esto es esencial para que se lleve a cabo la replicación del mRNA. La región en *cis* que actúan como el promotor mínimo se indica en azul (Tomado de Chen y Patton, 1998).

dar origen a una estructura del tipo tallo-asa (stem-loop); c) el codón de inicio no está en dúplex y se localiza inmediatamente río abajo de la estructura tallo-asa en el extremo 5'; y d) una región de 31 nt río abajo del codón de inicio y otra de 30 nt río arriba de la región de cadena sencilla (12 nt 3'-terminales) interaccionan para formar el "panhandle" (agarradera), en donde se yuxtaponen los extremos 5' y 3' del mRNA. Se ha determinado que el aspecto más sobresaliente de la estructura de "panhandle", que resulta esencial para la replicación, es la extensión en cadena sencilla de los 12 nt 3'-terminales, ya que cuando esta región se induce a formar un duplex a través de mutaciones en el gene o por

complementaridad con oligos, se reduce la síntesis de la hebra negativa (3'→5') en el sistema de “nucleocápsidas abiertas” (Chen y Patton, 1998). Interesantemente, el bloqueo en la replicación de los mRNAs mutantes en que los 12 nucleótidos 3'-terminales forman un dúplex no está en su incapacidad de unir eficientemente VP1. Además de las secuencias en *cis* de los UTRs, que estimulan la replicación a través de la unión de factores tales como VP1, se ha establecido que existen secuencias internas que promueven el plegamiento del RNA para que los extremos 5' y 3' se yuxtapongan adecuadamente formando la estructura de “panhandle”. Se ha propuesto que los complejos de VP1-VP2-VP3 podrían catalizar la formación del “panhandle”, a través de su interacción con los extremos 5' y 3' del mRNA, promoviendo su acercamiento (Chen y Patton, 1998).

E) Formación del virión maduro y liberación de la célula.

Una vez formadas, las partículas VP6 RI (DLPs) abandonan los viroplasmias y adquieren la cubierta externa de proteínas atravesando la membrana del RE. Las glicoproteínas virales VP7 y NSP4 se encuentran como proteínas integrales en esta membrana, y adosada en la cara externa está la proteína VP4 (Chan *et al.*, 1988; Ericson *et al.*, 1983; Kabcenell y Atkinson, 1985; González *et al.*, 2000). NSP4 es una proteína transmembranal que presenta dominios de unión para VP6 y VP4 y funciona como el receptor de las DLPs (Tabla 1; Au *et al.*, 1989; Au *et al.*, 1993) Durante la gemación de las DLPs a través de la membrana del RE, las partículas virales adquieren una membrana transitoria, que posteriormente es removida en el interior del RE por un mecanismo desconocido. Los viriones maduros salen de la célula cuando ésta se rompe; adicionalmente, se ha reportado que en células polarizadas en cultivo los viriones pueden

ser excitados a través de la superficie apical (Estes y Cohen, 1989; Svensson *et al.*, 1991).

Los productos del gene 11.

El único segmento de los rotavirus con ORFs para dos proteínas diferentes es el 11 (Tabla 1). Este segmento tiene 664 pb en el rotavirus YM (Figura 6). La proteína NSP5 está codificada por un ORF que inicia en el nt 22 y se extiende hasta el nt 612. En un ORF alternativo (+1), situado entre los nts 80 y 355, está codificada la secuencia para la proteína NSP6. Las dos proteínas se expresan *in vivo* y se localizan en los viroplasmos (López y Arias, 1993; Mattion *et al.*, 1991; Welch *et al.*, 1989).

NSP5 es una proteína de 197-200 aminoácidos (aa), y aunque el peso molecular (Mr) predicho es de 22 kDa, es traducida *in vitro* con un Mr de 25 kDa, y en células infectadas con rotavirus exhibe varias isoformas con Mrs de 26, 28 y 30-34 kDa. NSP5 es modificada por la adición de monosacáridos de N-acetilglucosamina unidos a través de enlaces de tipo O, y por fosforilación en residuos de Ser y Thr, los cuales representan un 25% del contenido total de aa. Aún no se ha identificado cuál es el papel de estas modificaciones en la función de NSP5, pero se sabe que las diferentes isoformas de esta proteína se originan por el nivel de fosforilación (Afrikanova *et al.*, 1996; Blackhall *et al.*, 1997; González y Burrone, 1991; Poncet *et al.*, 1997). En los rotavirus del grupo A NSP5 es una proteína muy conservada, con homologías que oscilan entre 83-98%. Dentro de las características generales de la secuencia de NSP5 sobresalen la presencia de una región variable entre los aminoácidos 112 y 132, una región ácida (aa 152-171), dos regiones básicas (aa 134-150 y 171-180) y dos cisteínas que son absolutamente conservadas, en las posiciones 170 y 173 (Figura 6; López y Arias, 1993; Mattion *et al.*, 1994).

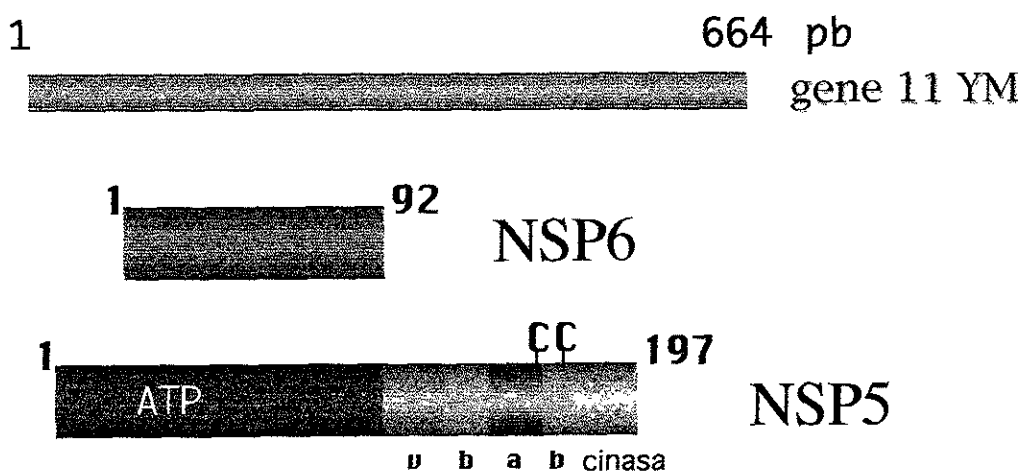


Figura 6. Las proteínas no-estructurales NSP5 y NSP6 son codificadas por el gene 11. Los ORFs de estas dos proteínas se encuentran desfasados en +1; son mostrados de acuerdo a su localización en el gene 11. Las principales características de la proteína NSP5 son: ATP, sitio de unión a ATP potencial; v, región variable; b, región básica; a, región ácida; cinasa, dominio con homología a las fosfógeno cinasas.

Se ha propuesto que NSP5 es una proteína cinasa que se autofosforila, y tiene un sitio aparente de unión a ATP y un dominio relacionado con las fosfógeno cinasas (Figura 6; Welch *et al.*, 1989; Mattion *et al.*, 1994; Afrikanova *et al.*, 1996; Blackhall *et al.*, 1997; Poncet *et al.*, 1997). También se han identificado sitios consenso de fosforilación potenciales para proteína cinasa C y caseína cinasa II (Blackhall *et al.*, 1997).

Utilizando el sistema de los dos híbridos de levadura y por coimmunoprecipitación de complejos de proteína entrecruzados *in vivo*, se determinó que NSP5 interacciona con NSP2, y posiblemente con VP1 (Poncet *et al.*, 1997; Afrikanova *et al.*, 1998). La región de interacción con NSP2 aparentemente está localizada en los primeros 38 aa del extremo amino de NSP5. NSP2 aumenta el nivel de hiperfosforilación (formas con Mr de 30-34 kDa) de NSP5 *in vitro* e *in vivo*; el complejo NSP5/NSP2 puede formar estructuras

similares a viroplasmos (pseudo-viroplasmos) en un sistema de expresión transitorio (Afrikanova *et al.*, 1998; Fabbretti *et al.*, 1999).

NSP6 es una proteína de 92 aa, con una Mr de 11 kDa (Figura 6). La proteína se ha identificado en células infectadas por rotavirus SA11, OSU y NCDV, y adicionalmente los genes 11 secuenciados de 25 cepas de rotavirus del grupo A presentan un ORF potencial para la expresión de NSP6 (con la excepción de Mc323 y Alabama). El rango de identidad de estas proteínas es de 82-99%. Los genes 11 de los rotavirus de los grupos B y C no exhiben este ORF (Chen *et al.*, 1990; Mattion *et al.*, 1991; Petric *et al.*, 1991; Bremont *et al.*, 1993; López y Arias, 1993; Jiang *et al.*, 1993).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se desconoce la función de los productos del gene 11 en la replicación de los rotavirus. Debido a que NSP5 y NSP6 se localizan en el viroplasma, y a que NSP5 se ha identificado como un componente de los RIs, se cree que su actividad está relacionada con la selección y el empaquetamiento de los RNAs positivos, o en la replicación del genoma. A NSP5 también se le ha atribuido un papel estructural en el ensamblaje de los viroplasma. De las propiedades identificadas en los productos del gene 11 destacan la fosforilación y la aparente actividad de cinasa de NSP5, que están poco documentadas. No hay una descripción completa de cómo NSP5, NSP6 y otras proteínas del viroplasma se relacionan entre sí a través de interacciones proteína-proteína específicas. Resulta significativo que la mayor parte de las proteínas del rotavirus tengan que estar como oligómeros para llevar a cabo sus actividades (Tabla 1), por lo que es de interés conocer si éste es también el caso para los productos del gene 11. La determinación de las asociaciones específicas entre proteínas, y el mapeo de los aminoácidos involucrados en el establecimiento de éstos complejos, puede conducir a la obtención de información relevante sobre la regulación de las propiedades de NSP5 y NSP6.

HIPOTESIS

Las evidencias experimentales sugieren que la proteína NSP5 de los rotavirus depende de su fosforilación y de sus asociaciones intermoleculares para llevar a cabo sus actividades en el ciclo de replicación de los rotavirus. Con base en estos antecedentes, las hipótesis de trabajo son las siguientes:

- I La fosforilación de NSP5 se debe principalmente a una actividad de cinasa intrínseca de la proteína. A través de esta propiedad un monómero de NSP5 podría incorporar fosfatos sobre sí mismo, lo que conduciría a la formación de las isoformas de 26 y 28 kDa.
- II. Mediante su homomultimerización NSP5 podría fosforilar en *trans*. La incorporación de fosfatos sobre moléculas de NSP5 vecinas produciría las isoformas hiperfosforiladas.
- III. La fosforilación de NSP5 podría ser regulada por su interacción con otras proteínas en el viroplasma, tales como NSP6.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Determinar cómo se lleva a cabo la fosforilación y cuáles son las asociaciones intermoleculares de la proteína NSP5 de los rotavirus.

Objetivos específicos:

1. Determinar si NSP5 tiene una actividad de cinasa intrínseca.
2. Evaluar la participación de cinasas celulares en la fosforilación de NSP5.
3. Identificar si NSP5 puede formar multímeros.
4. Determinar si la fosforilación de NSP5 y la formación de viroplasmata dependen de la multimerización de NSP5.
5. Identificar si NSP5 establece interacciones específicas con NSP6.

METODOS

La mayor parte de los métodos utilizados en este trabajo están descritos en la sección *Methods* del artículo anexo. Aquí se detallan otros métodos que se emplearon para obtener los resultados que no están incluidos en el artículo.

Fosforilación de proteínas *in vivo* e *in vitro*. Células MA104 infectadas con el rotavirus YM se lisaron a diferentes tiempos postinfección en un amortiguador que contenía 150 mM de NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 1% Tritón X-100, 20 µg/ml PMSF, 2 µg/ml aprotinina, 2 µg/ml leupeptina. Los lisados se trataron con un suero monoespecífico anti-NSP5 de conejo (González *et al.*, 1998) para obtener inmunoprecipitados de NSP5. Las proteínas se mantuvieron unidas a las esferas de proteína A-Sepharosa (fase sólida) y se incubaron durante 30 min en 20 µl de un amortiguador de cinasa (Tris-Cl 50 mM, pH 7.5, MgCl₂ 5 mM) suplementado con 10 µCi de γ -³²P-ATP. Cuando se emplearon inhibidores de cinasas (Tabla 2) éstos se preincubaron con la proteína NSP5 unida a la fase sólida durante 15 min en hielo, y luego se mantuvieron durante todo el ensayo de fosforilación *in vitro* (Karaszkievics y Henrich, 1997). Para obtener NSP5 fosforilada *in vivo* a a cultivos de células MA104 infectadas con rotavirus se añadieron 200 µCi/ml de ³²P_i (8500-9120 Ci/mmol, NEN), a partir del inicio de la infección y hasta que las células se lisaron en el amortiguador descrito arriba; después se siguió el protocolo de inmunoprecipitación convencional. Las proteínas NSP5 recombinantes se purificaron por afinidad y se mantuvieron unidas a la resina en los ensayos de cinasa *in vitro*. La incorporación de ³²P en NSP5 se determinó por SDS-PAGE y autoradiografía.

Inmunofluorescencia. Células MA104 se cultivaron sobre cubreobjetos de vidrio a aproximadamente un 80% de confluencia y se infectaron con el rotavirus YM a 1 f.f.u./célula, o con el virus de vaccinia vTF7-3 a una m.o.i. de 10 p.f.u./célula para expresar transitoriamente proteínas, como es descrito en el artículo anexo. Las células infectadas con rotavirus o con vaccinia, a 6 y 24 horas postinfección, respectivamente, se fijaron con para-formaldehído/PBS al 2% durante 20 min, y se permeabilizaron con un amortiguador de bloqueo-Tritón (NH_4Cl /PBS 50 mM, BSA 1%, Tritón X-100 al 0.5%) durante 15 min. Después se incubaron con los anticuerpos específicos (monoclonal anti-NSP2 de ratón, 952 , 1:750; suero anti-NSP5 de conejo, C6, 1:250) diluïdos en amortiguador de bloqueo-Tritón durante 1 hr. Al término de este periodo se agregaron los anticuerpos anti-ratón y anti-conejo conjugados (anti-conejo 488, Alexa; anti-ratón 568, Alexa) diluïdos en amortiguador de bloqueo-Tritón 1:150, que se mantuvieron en contacto con las células durante 1 hr. Todo el procedimiento se llevó a cabo a temperatura ambiente y entre cada paso se hicieron 3 ó 4 lavados con NH_4Cl /PBS 50 mM. Las células se montaron sobre portaobjetos con glicerol/PBS al 70%. Posteriormente, las preparaciones se observaron por microscopía confocal utilizando un microscopio Bio-Rad MRC-600 y el “software” CoMos MPL-1000. Todos los planos confocales analizados fueron de 0.54 μm de grosor; para las dobles tinciones se utilizaron los filtros 488-568, y para los dos fluoróforos se visualizaron los mismos planos confocales. Como un control negativo células sin infectar fueron teñidas y se analizadas bajo condiciones idénticas.

RÉSULTADOS

I) RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LOS OBJETIVOS 3, 4 Y 5.

“The C-terminal domain of rotavirus NSP5 is essential for its multimerization, hyperphosphorylation and interaction with NSP6”

Se incluyen en este artículo el cual fue publicado en el Journal of General Virology en el mes de marzo del 2000

The C-terminal domain of rotavirus NSP5 is essential for its multimerization, hyperphosphorylation and interaction with NSP6

Miguel A. Torres-Vega,¹ Ramón A. González,^{1†} Mariela Duarte,² Didier Poncet,³ Susana López¹ and Carlos F. Arias¹

¹Departamento de Genética y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62250, Mexico

²Laboratoire de Génie Protéique et Cellulaire, Université de la Rochelle, La Rochelle cedex 01, France

³Laboratoire de Virologie et Immunologie Moléculaires, INRA, Domaine de Vilvert, 78352 Jouy-en-Josas cedex, France

Rotavirus NSP5 is a non-structural phosphoprotein with putative autocatalytic kinase activity, and is present in infected cells as various isoforms having molecular masses of 26, 28 and 30–34 kDa. We have previously shown that NSP5 forms oligomers and interacts with NSP6 in yeast cells. Here we have mapped the domains of NSP5 responsible for these associations. Deletion mutants of the rotavirus YM NSP5 were constructed and assayed for their ability to interact with full-length NSP5 and NSP6 using the yeast two-hybrid assay. The homomultimerization domain was mapped to the 20 C-terminal aa of the protein, which have a predicted α -helical structure. A deletion mutant lacking the 10 C-terminal aa (Δ C10) failed to multimerize both in yeast cells and in an *in vitro* affinity assay. When transiently expressed in MA104 cells, NSP5 became hyperphosphorylated (30–34 kDa isoforms). In contrast, the Δ C10 mutant produced forms equivalent to the 26 and 28 kDa species, but was poorly hyperphosphorylated, suggesting that multimerization is important for this proposed activity of the protein. The interaction domain with NSP6 was found to be present in the 35 C-terminal aa of NSP5, overlapping the multimerization domain of the protein, and suggesting that NSP6 might have a regulatory role in the self-association of NSP5. NSP6 was also found to interact with wild-type NSP5, but not with its mutant Δ C10, in cells transiently transfected with plasmids encoding these proteins, confirming the relevance of the 10 C-terminal aa for the formation of the heterocomplex.

Introduction

Rotaviruses, members of the family *Reoviridae*, are the major aetiological agents of gastroenteritis in children and young animals (Kapikian & Chanock, 1996). These viruses are formed by three concentric layers of proteins that enclose a genome of 11 segments of double-stranded (ds) RNA. The core of the virion is composed predominantly of protein VP2, which forms the innermost layer and surrounds the viral genome, and small amounts of proteins VP1 and VP3. The intermediate layer is formed by VP6, the major capsid protein

The outermost layer is formed by two proteins, VP4 and VP7 (Prasad & Chiu, 1994). In addition to these structural proteins, six non-structural viral proteins, NSP1 to NSP6, can be found in infected cells (Estes & Cohen, 1989).

Rotaviruses replicate in the cytoplasm of cells, and viral RNA packaging, assortment and replication, as well as assembly of the double-layered particles is thought to occur in viroplasm, large cytoplasmic electron-dense structures rich in viral proteins and RNA (Estes & Cohen, 1989). The structural proteins VP1, VP2, VP3 and VP6, and the non-structural proteins NSP2, NSP5 and NSP6, are all localized to viroplasms (Estes & Cohen, 1989; González *et al.*, 1998; Patton, 1995).

Patton and coworkers characterized macromolecular structures that are intermediates in rotavirus replication (RIs) (Patton, 1995). Three distinct RIs were separated by gel electrophoresis, which were relatively enriched in different sets

Author for correspondence: Carlos Arias
Fax +52 73 172388. e-mail arias@ibt.unam.mx

† Present address: Department of Molecular Biology, Princeton University, Princeton, NJ 08540, USA.

of proteins: the precore RI (VP1, VP3, NSP1 and NSP3), the core RI (VP1, VP2, VP3, NSP2 and NSP5) and the VP6 RI (VP1, VP2, VP3, VP6 and NSP2). All three RIs were shown to have associated RNA replicase activity (Gallegos & Patton, 1989). In addition, a viral RNA-protein complex with RNA replication activity, and containing NSP2, VP1, VP2 and VP6 proteins, was precipitated from rotavirus-infected cells by using an NSP2-specific monoclonal antibody (Aponte *et al.*, 1996). Despite the multiple protein interactions that should occur in these RIs to coordinate the RNA replication and morphogenesis of the virions, specific protein-protein contacts in either viroplasm or the isolated replication complexes have been poorly studied.

Among the non-structural proteins present in the identified RIs is NSP5, an *O*-glycosylated phosphoprotein of 197–200 aa, with putative autocatalytic kinase activity (Blackhall *et al.*, 1997; González & Burrone, 1991; Poncet *et al.*, 1997; Welch *et al.*, 1989). Depending on its degree of phosphorylation, NSP5 can exist as several isoforms with molecular masses of 26, 28 and 30–34 kDa (Afrikanova *et al.*, 1996; Blackhall *et al.*, 1997; Poncet *et al.*, 1997). This protein, which is able to form homo-oligomers (González *et al.*, 1998; Poncet *et al.*, 1997), has been shown to interact with NSP2 (Afrikanova *et al.*, 1998; Poncet *et al.*, 1997), and this association was found to up-regulate the NSP5 hyperphosphorylation activity, and to allow the formation of viroplasm-like structures (Afrikanova *et al.*, 1998; Fabbretti *et al.*, 1999). NSP5 has also been proposed to interact with the virus polymerase VP1 (Afrikanova *et al.*, 1998), and the non-structural 11 kDa protein NSP6 (González *et al.*, 1998; Mattion *et al.*, 1991). NSP5 and NSP6 are encoded in alternative open reading frames (ORFs) of the genomic dsRNA segment 11 (Mattion *et al.*, 1991).

In this work we describe the mapping of the domains of NSP5 responsible for homomultimerization, and for the interaction with NSP6, and report the existence of a correlation between the ability of NSP5 to self-associate and its capacity to be hyperphosphorylated.

Methods

■ **Protein labelling and immunoprecipitation assays.** Confluent epithelial MA104 cells on six-well plates were infected with porcine rotavirus YM at an m.o.i. of 2 immunoperoxidase focus units per cell. The proteins were metabolically labelled with 50 μ Ci/ml of Easy Tag Express-^[35S] protein labelling mix (1175 Ci/mmol, NEN), for 5 h, starting at 3 h post-infection. After the labelling period, the cells were solubilized in 300 μ l of lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 20 μ g/ml PMSF, 2 μ g/ml aprotinin, 2 μ g/ml leupeptin) for 10 min on ice. Immunoprecipitation assays were carried out as described by González *et al.* (1998), using rabbit hyperimmune serum to rotavirus YM NSP5 (González *et al.*, 1998) or to rotavirus RF NSP6 (M. Duarte, N. Castagné, E. Gault & D. Poncet, unpublished data) proteins synthesized in bacteria.

■ **Construction of expression vectors.** All the NSP5 and NSP6 gene expression constructs were derived from the porcine rotavirus YM

gene 11 (664 nucleotides long) cloned in plasmid pGEM-3Z (López & Arias, 1993), using standard recombination techniques. This plasmid is referred to in this work as YM11/pGM. A cDNA fragment encoding the 197 aa ORF of YM NSP5 (contained between nucleotides 22 and 612 of gene 11) was obtained by digestion of YM11/pGM with *Eco47III* (which cuts at nucleotide 9 of dsRNA 11) and *SmaI* (located in the vector polylinker). This DNA fragment was further digested with *DraI* and *BclI* (which cut at nucleotides 68 and 411, respectively, of YM gene 11) to obtain the 92 aa out-of-phase (+1) ORF that encodes NSP6 (comprised of nucleotides 80–355 of gene 11). (Mattion *et al.*, 1991). For the yeast two-hybrid assay, the NSP5 and NSP6 cDNAs fragments described above were cloned into yeast vectors pGBT9 and pGAD424 (Clontech), to be expressed, respectively, as fusion polypeptides with the DNA binding (BD) and activation (AD) domains of the yeast activator GAL4. In this way plasmids NSP5/pGB, NSP6/pGB, NSP5/pGD and NSP6/pGD were generated. In addition, the NSP5 and NSP6 cDNAs were cloned into the multiple cloning site of yeast vectors pAS2-1 and pACT2 (Clontech) to generate plasmids NSP5/pAS2-1 and NSP6/pACT2, which overproduce the NSP5-BD and NSP6-AD hybrid proteins, respectively. In most experiments, the NSP6 protein was expressed from yeast vectors containing the gene 11 cDNA fragment between restriction sites *DraI* and *SmaI*, described above.

Deletion mutants of NSP5 were constructed to map protein-protein interaction domains. The NSP5 DNA regions described for mutants Δ C66 and Δ N130 in Fig. 2 were obtained from plasmid NSP5/pGB by digestion with *BclI*, which cuts after the nucleotide triplet encoding aa 130 of NSP5, and a second restriction enzyme with sites present either side of the plasmid polylinker. The NSP5 regions contained in all other deletion mutants were amplified by PCR using as template plasmid NSP5/pGB, and all mutants were cloned into pGBT9. The NSP5 mutant CdmS, in which cysteine residues 170 and 173 were substituted by serine residues, was constructed using two oligonucleotides (forward and backward) which introduced the suitable nucleotide changes, and the two PCR products were cloned sequentially into plasmid pGBT9. All constructs used in the two-hybrid system were verified by nucleotide sequencing of the cloning junction region, to ensure that the coding region of either NSP5 or NSP6 was in-frame with the AD or BD of GAL4. Dimerization of vimentin was used as a positive control in two-hybrid assays. Human vimentin cloned in plasmids pGBT9 and pGAD424 was kindly provided by J. F. Hess (University of California, Davis, CA, USA).

To synthesize histidine-tailed rotavirus non-structural proteins in bacteria, the ORFs corresponding to NSP5 and its mutant Δ C10 (Fig. 2), as well as that of NSP6 (amplified by PCR, and containing exclusively the NSP6 ORF, nucleotides 80–355, plus a stop codon), were cloned in bacterial plasmid pET28a⁺ (NSP5/pET, Δ C10/pET or NSP6/pET, Novagen). This plasmid is designed to add histidine tails to the N terminus of proteins, and about 24 extra aa after the tail are also included, depending on the cloning site used. The bacterial strain used for expression of the recombinant genes was BL21(DE3).

For expression in MA104 cells using the vaccinia virus-T7 transient expression system (Fuerst *et al.*, 1986), the cDNAs encoding wild-type (wt) NSP5, Δ C10 and NSP6 (obtained from plasmid NSP6/pET, containing about 15 extra aa at the N terminus of the protein, but not the His-tail) were cloned in plasmid pcDNA3.1/Hygro^r (Invitrogen). The generated plasmids are referred to as NSP5/pcDNA, Δ C10/pcDNA and NSP6/pcDNA, respectively.

■ **Yeast two-hybrid assay.** This assay was performed as described by González *et al.* (1998). When constructions in vectors pAS2-1 and

pACT2 were used, the yeast strain Y187 was employed. β -galactosidase activity was detected using X-Gal (Boehringer Mannheim).

■ **In vitro transcription and translation.** The *in vitro* transcription and translation reactions were done essentially as described by López *et al.* (1994). The NSP5 mRNA was transcribed from NSP5/pGM using T7 RNA polymerase. The luciferase mRNA was purchased from Promega.

■ **Affinity assay.** The bacteria transformed with constructions in plasmid pET28a⁺ were grown to $A_{600} = 0.6$, and induced to express His-tailed proteins with 1 mM IPTG. Lysates were prepared by sonication three times for 20 s in binding buffer (20 mM imidazole, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.9, 20 μ g/ml PMSF) plus 1% Triton X-100, and incubated for 15 min at room temperature. For the affinity assay, 300 μ l of lysate, representing 3 ml of culture, was incubated for 20 min, at 25 °C, with 60 μ l of 50% Ni²⁺-NTA agarose (Qiagen) in binding buffer. Next, 5 μ l of the *in vitro* translated, ³⁵S-labelled proteins was added, and the mixture was incubated for 2 h at 4 °C. The agarose beads were then washed once with binding buffer and three times with wash buffer (60 mM imidazole, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.9), and the protein complexes bound to the beads were released by boiling in 40 μ l of 2 \times Laemmli sample buffer and analysed by SDS-PAGE, Coomassie blue staining and fluorography.

■ **Transient gene expression.** MA104 cells (70–80% confluent) on 12-well plates were infected with vaccinia virus vTF7-3 (Fuerst *et al.*, 1986), kindly provided by B. Moss (NIAID, NIH, Bethesda, MD) at an m.o.i. of 10 p.f.u. per cell. After 30 min incubation, the inoculum was removed, and a mixture of lipofectamine (Gibco BRL) and 125 ng of each plasmid was added. The cells were further incubated for a period of 6 h, after which the lipofectamine-DNA complex was removed. The transfected cells were metabolically labelled at 21 h post-infection for 2.5 h with either 50 μ Ci/ml of Easy Tag Express-[³⁵S] protein labelling mix (1175 Ci/mmol, NEN) or 100 μ Ci/ml of ³²P_i (8500–9120 Ci/mmol, NEN). When used, the phosphatase inhibitor okadaic acid (Gibco BRL) was added to cultures at 0.5 μ M during the labelling period (Blackhall *et al.*, 1998). After metabolic labelling, the cells were solubilized in lysis buffer, and the proteins were immunoprecipitated as described in González *et al.* (1998).

■ **Western blot analysis.** Extracts were prepared from yeast cell pellets obtained from 10 ml of liquid cultures with an $A_{600} = 0.6$. The cell pellets were disrupted in 0.1 ml SoE buffer (0.9 M sorbitol, 0.1 M EDTA, pH 8, 20 μ g/ml PMSF), supplemented with 4 μ l Laemmli sample buffer and 40 μ l of acid-washed 0.5 mm glass beads, by vortexing three times for 1 min each. Finally, 96 μ l of Laemmli sample buffer was added and the samples were boiled for 3 min, cooled on ice, and centrifuged for 5 min at 4 °C; 10 μ l of the resulting supernatants or 20 μ l of MA104 infected cell lysates (described above) were loaded on SDS-polyacrylamide gels. After electrophoresis the proteins were transferred to nitrocellulose membranes and probed with hyperimmune serum to NSP5 (González *et al.*, 1998) (diluted 1:1000 in PBS–5% non-fat milk–0.2% Tween 20), or a monoclonal antibody to GAL4-AD (Clontech, diluted 1:7500, as mentioned above). The membranes were then incubated with peroxidase-conjugated secondary antibodies, and finally developed with the Amersham enhanced chemiluminescence detection system.

■ **Secondary structure prediction.** The secondary structures of the NSP5 and NSP6 proteins were predicted by the Predator method (Frishman & Argos, 1996). This method, available from http://pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_server.html, is based on recognition of potentially hydrogen-bonded residues in a single amino acid sequence. The amino acid sequences were obtained for the following rotavirus strains for NSP5 group A rotaviruses, YM (GenBank accession

no. X69486), CC86 (X80537), C60 (D00474), Mc323 (U54772), Mc345 (U54773), CN86 (X80538), v183 (X76779), Z10262 (AAB57810), OSU (X15519), SAI1 (X07831), RF (J. Cohen, unpublished data), UK (K03385), VMRI (M33606), Alabama (J04361), Wa (V01191), DS-1 (MNXRDS), v252 (X76780), v158 (X76778), v47 (X76781), v51 (X76782), v61 (X76783), RV-5 (PI8037), B37 (M28378), v115 (X76777) and 69M (MNXR69); for NSP5 group C rotaviruses, Cowden (X65938), Bristol (AAA47354) and Shintoku (L12391); for NSP6 group A rotaviruses, YM, CC86, CN86, C60, v183, Wa, Z10262, Mc345, SAI1, UK, RF, DS-1, RV-5, B37, v252, v51, v115, v158, v47, v61, 69M, VMRI and OSU. The predicted structures that were shared by all the sequences analysed for each protein are shown in Fig. 6.

Results

Proteins expressed from rotavirus YM gene 11 in MA104 cells

It has been reported that rotavirus gene 11 encodes two non-structural proteins, NSP5 and NSP6 (Mattion *et al.*, 1991; Welch *et al.*, 1989). As the first step in the characterization of the NSP5 homomultimers and the NSP5–NSP6 hetero-complexes, we wanted to confirm that the two polypeptides were expressed in rotavirus YM-infected MA104 cells. With a mono-specific serum to NSP5, several proteins with molecular masses of 26, 28 and 30–35 kDa were precipitated from lysates of YM-infected cells (Fig. 1A, lane 2) which were not present in mock-infected cells (Fig. 1A, lane 1). These proteins have been shown to represent NSP5 species that differ in their

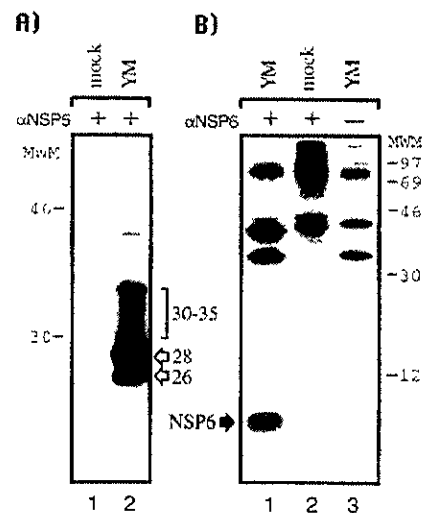


Fig. 1. Synthesis of the non-structural proteins NSP5 and NSP6 in rotavirus YM-infected MA104 cells. Mock-infected and YM-infected cells were labelled with ³⁵S, as described in Methods. At 8 h post-infection the cells were solubilized in non-denaturing lysis buffer, and immunoprecipitated with hyperimmune serum to either NSP5 (A) or NSP6 (B). The immunoprecipitated proteins were analysed by SDS-PAGE and fluorography in 11% (A) and 15% (B) polyacrylamide gels. Lane 3 in (B) shows the proteins bound non-specifically to protein A in the absence of antiserum.

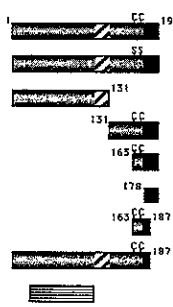
	GAL4AD			
	wt NSP5	NSP6	pGAD424	vimentin
wt NSP5	+++	+	-	-
CdmS	++	+	N.D.	-
ΔC66	-	-	-	-
ΔN130	++++	+	-	-
ΔN162	++++	++	-	-
ΔN177	+++	-	N.D.	N.D.
ΔN162ΔC10	-	-	N.D.	-
ΔC10	-	-	N.D.	-
NSP6	-	-	N.D.	N.D.
pGBT9	-	-	N.D.	N.D.
vimentin	-	-	N.D.	++++

Fig. 2. *In vivo* mapping of intermolecular associations of rotavirus protein NSP5. The variable region of NSP5, located between aa 112 and 132 in rotavirus YM, is indicated by a diagonally hatched box. Two conserved cysteine (C) residues, at aa positions 170 and 173, are shown. The kinase-like domain spanning aa 175–195 is depicted by a black box. The mutant NSP5 proteins used in this study are also shown. The NSP6 protein, which is coded by an out of phase (+1) ORF in rotavirus gene 11, is depicted (as is NSP5) according to the relative position of the gene 11 region that encodes it. The various constructions were expressed as fusion proteins with the DNA binding (GAL4BD) and activation (GAL4AD) domains of GAL4, as indicated. The blue colour appearance in the two-hybrid analysis was recorded as follows: + + + +, \leq 60 min; + + +, \leq 120 min; + +, \leq 210 min; +, \leq 360 min; -, no colour after 8 h incubation with X-Gal; N.D., not determined. At 8 h the intensity of the yeast blue phenotype correlated with the time of blue colour appearance, i.e., the earlier the blue colour appeared, the stronger it was.

degree of phosphorylation (Afrikanova *et al.*, 1996; Blackhall *et al.*, 1997; Poncet *et al.*, 1997). A rabbit hyperimmune serum to NSP6 immunoprecipitated a protein with a molecular mass of 10 kDa from the rotavirus YM-infected cell lysates (Fig. 1B, lane 1), but not from lysates of mock-infected cells (Fig. 1B, lane 2). Several additional bands of higher molecular mass were present in the immunoprecipitate of YM-infected cells; however, these bands were non-specifically precipitated, since they were also observed in the absence of the serum to NSP6 (Fig. 1B, lane 3). NSP6 had been previously identified by immunoprecipitation of rotavirus SA11-infected cells, in which the protein exhibited a molecular mass of 11 kDa (Mattion *et al.*, 1991). These data clearly show that both NSP5 and NSP6 are being expressed from rotavirus YM gene 11.

In vivo determination of the multimerization domain of rotavirus NSP5

To map the NSP5 region involved in homomultimerization we used the yeast two-hybrid assay. For this, deletion mutants of the protein (Fig. 2) were synthesized as fusion polypeptides with the DNA binding domain of GAL4 (GAL4-BD). The C-terminal mutant ΔC66 was found not to interact with wt NSP5 fused to the activation domain of GAL4 (GAL4-AD) (Fig. 2). On the other hand, N-terminal mutants ΔN130, ΔN162 and ΔN177 still associated with the wt protein; in fact, the interaction of mutants ΔN130 and ΔN162 with the complete protein was even more efficient than that obtained with the wt NSP5 homomultimer (Fig. 2). The NSP5 mutant ΔN162

interacted with itself as efficiently as the wt homomultimer (not shown), indicating that the multimerization domain of NSP5 localizes exclusively to the 36 C-terminal aa residues of the protein. Furthermore, the fact that mutant ΔN177, which encodes only the 20 C-terminal aa of NSP5, was still able to interact with wt NSP5 further defined the multimerization domain to this region. The elimination of the 10 C-terminal aa from the full-length protein (mutant ΔC10) completely abolished the interaction with wt NSP5 (Fig. 2), and mutant ΔN162ΔC10, derived from construct ΔN162, was affected in the same way. These results clearly show that the 10 C-terminal aa of NSP5 are essential for multimerization of the protein.

The role in multimerization of the NSP5 conserved cysteine residues located at aa positions 170 and 173 was also evaluated. For this, we changed, by site-directed mutagenesis, the two cysteine residues to serine residues (Fig. 2, mutant CdmS). The double-mutant protein CdmS maintained the ability to interact with wt NSP5, although the interaction was slightly weaker than that achieved with the wt NSP5 multimer (Fig. 2), indicating that these conserved cysteine residues are not essential for multimerization of the protein.

In vitro determination of the multimerization domain of NSP5

The relevance of the 10 C-terminal aa of NSP5 for the formation of multimers was examined *in vitro*. Wild-type NSP5, and the deletion mutant ΔC10, were expressed in

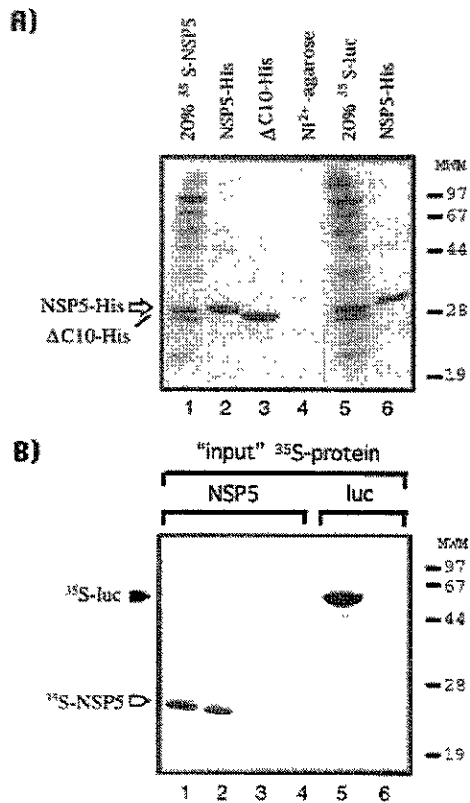


Fig. 3. The C-terminal region of NSP5 is essential for multimerization *in vitro*. Recombinant NSP5-His and Δ C10-His proteins, bound to Ni^{2+} -agarose, were incubated with ^{35}S -labelled NSP5 or luciferase (luc) for 2 h at 4 °C. After extensive washing, the protein complexes bound to beads were recovered by boiling, and analysed by SDS-PAGE. (A) Coomassie blue staining of a polyacrylamide gel showing, in lanes 2, 3 and 6, the indicated proteins used to capture the 'input' ^{35}S -labelled polypeptides. Lane 4 is a negative control in which only Ni^{2+} -agarose beads (with no proteins bound) were incubated with the 'input' NSP5. Lanes 1 and 5 show 20% of the input volume of the *in vitro* translation products employed in the affinity assay. (B) Autoradiogram of the gel in (A) showing the ^{35}S -labelled proteins which were specifically retained by the histidine-tagged proteins coupled to Ni^{2+} -agarose.

bacteria with a tail of six histidine residues at their N terminus (NSP5-His). The Ni^{2+} affinity-purified fusion proteins had an apparent molecular mass of 30 and 28 kDa, respectively (Fig. 3 A, lanes 2 and 3). These proteins were tested for their ability to interact with [^{35}S]methionine-labelled NSP5 and luciferase (as negative control) proteins synthesized in a rabbit reticulocyte lysate. The *in vitro* produced NSP5 and luciferase polypeptides showed molecular masses of 25 kDa and 61 kDa, respectively (Fig. 3 B, lanes 1 and 5). In this affinity assay, the soluble *in vitro* translated ^{35}S -labelled proteins were added to the histidine-tagged proteins bound to Ni^{2+} -agarose, and the mixture was incubated for 2 h at 4 °C. After extensive washes, the protein complexes that remained attached to the Ni^{2+} -agarose beads were recovered and analysed by SDS-PAGE, Coomassie blue staining and autoradiography. Radioactive NSP5 bound to

NSP5-His (Fig. 3 B, line 2), but it did not attach to control Ni^{2+} -agarose beads (Fig. 3 B, lane 4). The specificity of the NSP5 multimerization was also shown by the fact that NSP5-His did not capture ^{35}S -labelled luciferase (Fig. 3 B, lane 6). Despite the fact that comparable amounts of NSP5-His and Δ C10-His proteins were used in the assay (Fig. 3 A, lanes 2 and 3), Δ C10-His did not interact with ^{35}S -labelled NSP5 (Fig. 3 B, lane 3), confirming that aa residues 188–197 of NSP5 are essential for multimerization.

Correlation between multimerization capacity and hyperphosphorylation of NSP5

Several species of NSP5, differing in their degree of phosphorylation, have been identified in rotavirus-infected cells (Afrikanova *et al.*, 1996; Blackhall *et al.*, 1997; Poncet *et al.*, 1997). These isoforms of NSP5, with relative molecular masses of 26, 28 and 30–34 kDa, are also present in lysates of rotavirus YM-infected MA104 cells (Fig. 1 A). To determine whether the multimerization of NSP5 influences its phosphorylation level, we transiently expressed in MA104 cells wt NSP5, and its mutant Δ C10 (which does not multimerize in the two-hybrid and *in vitro* affinity assays), and compared their *in vivo* phosphorylation pattern.

The NSP5 and Δ C10 genes were cloned under the control of the T7 RNA polymerase promoter in the expression vector pCDNA3.1/Hygro^r, and these constructions were transfected into MA104 cells previously infected with vaccinia virus vTF7-3 (Fuerst *et al.*, 1986). The transfected cells were labelled with ^{32}P , and lysates of these cells were immunoprecipitated with a hyperimmune serum to NSP5 and analysed by SDS-PAGE and autoradiography. In the absence of any other rotavirus protein, NSP5 was present in the multiple isoforms previously described (Fig. 4, lane 1). An additional faintly phosphorylated polypeptide of 23 kDa was observed, which could represent the initiation of translation at a second in-phase methionine located at aa position 52 (Mattion *et al.*, 1991). On the other hand, mutant Δ C10 showed that the species equivalent to the 26 and 28 kDa forms of the wt protein accumulated (labelled in Fig. 4 as 30 and 28 kDa proteins, respectively, since they contain about 15 extra aa at their N termini; see Methods), but the hyperphosphorylated forms were barely distinguished (Fig. 4, lane 2). A short NSP5 product of about 22 kDa was also observed in Δ C10, which most probably represents, as described above, a polypeptide result of the initiation of translation at methionine 52. This 22 kDa protein seems to be more efficiently phosphorylated than the corresponding polypeptide derived from the wt gene. Addition of okadaic acid, a phosphatase inhibitor, to the transfected cell cultures increased the amount of hyperphosphorylated species in both NSP5 and Δ C10, but the hyperphosphorylated isoforms were much more evident in wt NSP5 as compared to the mutant protein (Fig. 4, lanes 3 and 4). These results suggest that the multimerization of NSP5 is

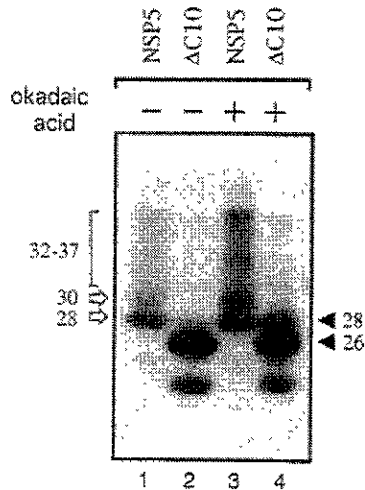


Fig. 4. Multimerization of NSP5 correlates with the presence of the hyperphosphorylated species of the protein *in vivo*. The genes encoding NSP5 and the mutant $\Delta C10$ were transiently expressed in MA104 cells using the vaccinia virus-T7 polymerase system (see Methods), and labelled with ^{32}P , for 2.5 h starting at 21 h post-infection (lanes 1–4), in the absence (lanes 1 and 2) or presence (lanes 3 and 4) of $0.5 \mu\text{M}$ okadaic acid. After the labelling period, the cells were disrupted in lysis buffer (see Methods) and aliquots were immunoprecipitated with a rabbit hyperimmune serum to NSP5. The immunoprecipitated proteins were separated in an 11% polyacrylamide gel and subjected to autoradiography. As described in Methods, the NSP5 proteins (wt and mutant $\Delta C10$) synthesized from the expression vectors used in the T7 polymerase system contain about 15 extra aa at their N termini. Thus, the 28 and 30 kDa phosphoproteins indicated by the open arrows correspond, respectively, to the 28 and 26 kDa observed in rotavirus-infected cells (see Fig. 1), filled arrowheads indicate the equivalent forms of $\Delta C10$. Hyperphosphorylated (32–37 kDa) species are also indicated

critical for the efficient generation of the hyperphosphorylated species of the protein.

***In vivo* mapping of the NSP5 domain that interacts with NSP6**

In a previous report it was shown that rotavirus YM NSP5 associates weakly but consistently with YM NSP6 in the yeast two-hybrid assay (González *et al.*, 1998). This interaction was also found to occur between YM NSP5 and NSP6 derived from the bovine rotavirus strain RF (not shown), which is 88% identical to YM NSP6, and has six extra aa at its C terminus. In this work, a more efficient interaction between YM NSP5 and NSP6 proteins was observed when the corresponding genes were subcloned into yeast vectors having stronger promoters than those previously used (Legrain *et al.*, 1994). With these vectors (pAS2-1 and pACT2), the signal of interaction between NSP5-BD and NSP6-AD was similar to that achieved with the association of p53 and the large T antigen, which were used as a positive control (the blue colour in both interactions appeared within the first hour of the assay; see also González *et al.*, 1998).

The recombinant proteins synthesized in yeast were characterized by Western blotting. A monoclonal antibody to

the AD of GAL4 identified a band of 33 kDa in extracts of yeast cells transformed with plasmid NSP6/pACT2, while antibodies to NSP5 detected a protein of 45 kDa cells transformed with plasmid NSP5/pAS2-1 (not shown). These are the expected molecular masses for the NSP6-AD and NSP5-BD hybrid polypeptides. The antibodies to NSP5 did not react with any protein in yeast cells transformed with NSP6/pACT2 (not shown).

To determine the region of NSP5 committed to the association with NSP6, we used the deletion mutants constructed to identify the NSP5 multimerization domain. The pattern of interaction between NSP6 and the various NSP5 mutants in the yeast two-hybrid system was the same as that found for the homomultimerization of NSP5, with the exception of mutant $\Delta N177$ (Fig. 2). This mutant, which retains only the 20 C-terminal aa residues of the protein, is able to interact with full-length NSP5, but not with NSP6. In addition, the fact that NSP5 mutant $\Delta N162$ associates with NSP6, while mutant $\Delta N162C10$ does not, suggests that the NSP5 region involved in the interaction with NSP6 is located within aa 163–197.

The heterocomplex NSP5–NSP6 also forms in MA104 cells

Immunoprecipitation of rotavirus YM-infected MA104 cells with polyclonal antibodies to either NSP5 or NSP6 resulted in the interaction of each serum with its corresponding protein, but no evidence of co-immunoprecipitation of the NSP5–NSP6 complex was found (not shown). To overcome the potential problem of not finding this interaction because of the low level of synthesis of NSP5 (Fig. 1; Mattion *et al.*, 1991) or due to the competition of NSP2, NSP6 or another rotavirus protein for binding to NSP5, we transiently co-expressed in MA104 cells the two proteins (NSP5 and NSP6) using the vaccinia virus-T7 RNA polymerase system (Fuerst *et al.*, 1986). The synthesized proteins, labelled with [^{35}S]methionine, were analysed by immunoprecipitation with monospecific sera to NSP5 or NSP6. In extracts of cells transfected with either NSP6/pcDNA alone or with plasmids encoding both NSP5 and NSP6, the hyperimmune serum to NSP6 immunoprecipitated a protein of 12 kDa (Figs 5B, lanes 3 and 4; and 5C, lane 2). This is the expected molecular mass for NSP6, plus 15 extra aa from the vector fused at its N terminus. The preimmune serum did not precipitate this polypeptide (Fig. 5A, lane 2). On the other hand, the hyperimmune serum to NSP5 immunoprecipitated from the double-transfected cells, in addition to NSP5, a band of 12 kDa (Figs 5B, lane 2; and 5C, lane 1). The 12 kDa band did not disappear after treatment of the cell lysates with RNase before immunoprecipitation with the serum to NSP5 (not shown), and was not immunoprecipitated from cells transfected only with NSP5/pcDNA (Fig. 5B, lane 1) or co-transfected with plasmids encoding NSP6 and the NSP5 deletion mutant $\Delta C10$ (Fig. 5C, lane 3). In addition, the serum to NSP5 did not recognize NSP6 in the

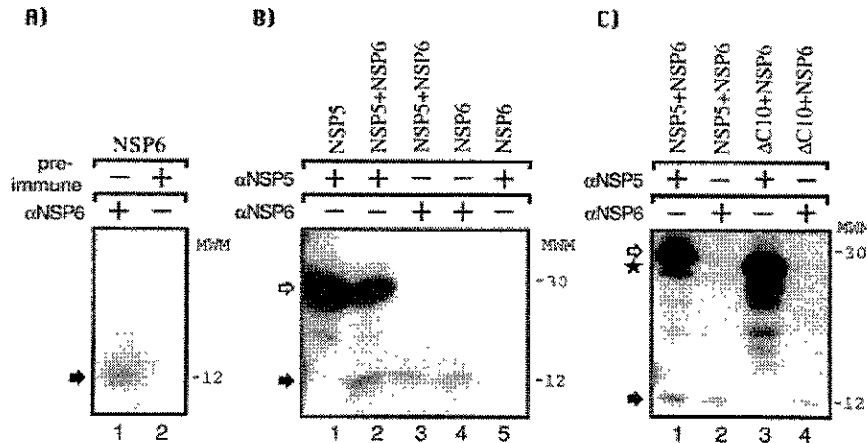


Fig. 5. NSP5 and NSP6 co-precipitate in transfected MA104 cells. NSP5, NSP6, Δ C10 or mixtures of these proteins were transiently expressed in MA104 cells (as indicated), using the vaccinia virus-T7 polymerase system (see Methods). The synthesized ^{35}S -metabolically labelled polypeptides were immunoprecipitated with the indicated antibodies. The proteins were resolved by SDS-PAGE in a 15% gel, which was later subjected to autoradiography. The gels shown in the three panels represent independent experiments. The open arrow indicates the wt NSP5 protein; the filled arrow indicates the NSP6 protein; the star indicates the mutant NSP5 protein Δ C10 (C, lane 3).

NSP6/pcDNA-transfected cells (Fig. 5 B, lane 5). Altogether, these results strongly suggest that rotavirus NSP5 and NSP6 proteins associate in eukaryotic MA104 cells, and confirm that the 10 C-terminal aa of NSP5 are necessary for this association.

Discussion

Viroplasm are electron-dense structures that can be observed in rotavirus-infected epithelial cells; they are formed by a dense array of structural and non-structural rotavirus proteins, and by viral RNA. Our knowledge of the specific protein-protein interactions that occur in viroplasm is limited; VP2 and VP6 assemble to form the double-shelled RI, enclosing the viral polymerase VP1 and the guanylyltransferase VP3. However, information about the role of the non-structural proteins and the associations they establish among themselves or with structural proteins is scarce. It has been described that NSP2 associates with NSP5 and VP1 (Afrikanova *et al.*, 1998; Kattoura *et al.*, 1994; Poncet *et al.*, 1997). Also, previous results have suggested the existence of NSP5 as a homomultimer (González *et al.*, 1998; Poncet *et al.*, 1997), and an interaction between NSP5 and NSP6 (González *et al.*, 1998; Mattion *et al.*, 1991).

In this work we have mapped the homomultimerization domain of NSP5 *in vitro* and *in vivo*. To map this domain *in vivo*, we used the yeast two-hybrid assay, which was shown to specifically detect the NSP5-NSP5 interaction (Fig. 2; González *et al.*, 1998). Contrary to this observation, the bovine rotavirus RF NSP5 has been found to spontaneously transactivate the reporter gene when fused to GAL4-BD (Poncet *et al.*, 1997). The fact that RF NSP5 has transactivation activity, while YM NSP5 does not, might be the consequence of amino

acid differences between these two proteins, which have an identity of 92%.

NSP5 is highly conserved in group A rotavirus strains, and one of the most conserved domains of the protein is the C-terminal region (Mattion *et al.*, 1994). This region is also the most conserved between group A and group C NSP5 proteins (Bremont *et al.*, 1993; Mattion *et al.*, 1994). For instance, the Bristol group C human strain has an overall identity of 24% with the group A porcine rotavirus strain YM, while the identity between the C-terminal 28 aa of these two proteins is 46%. Furthermore, the prediction of the secondary structure of both group A and C NSP5 polypeptides showed that the 20 C-terminal aa has an α -helical structure (Fig. 6). The fact that this region includes the homomultimerization domain of group A NSP5 suggests that group C NSP5 may also form multimers, and in turn implies that this property is important for the function of NSP5.

NSP5 has been suggested to have serine/threonine protein kinase activity (Afrikanova *et al.*, 1996; Blackhall *et al.*, 1997; Poncet *et al.*, 1997). There is, however, no relevant homology between NSP5 and most protein kinases, and the initial description of the amino acid sequence similarity between NSP5 and guanido kinases encompasses a region of the latter that is not conserved among the family (Suzuki & Furukohri, 1994) and that seems not to have a relevant role in the catalytic, ATP-binding or substrate recognition activities of the protein kinases (Fritz-Wolf *et al.*, 1996). Despite this, other cellular and viral kinases without the serine/threonine canonical kinase motifs have been reported (Rossi *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1990), thus NSP5 could belong to this group of 'non-conventional' kinases.

Our results showed that mutant Δ C10, which was not able

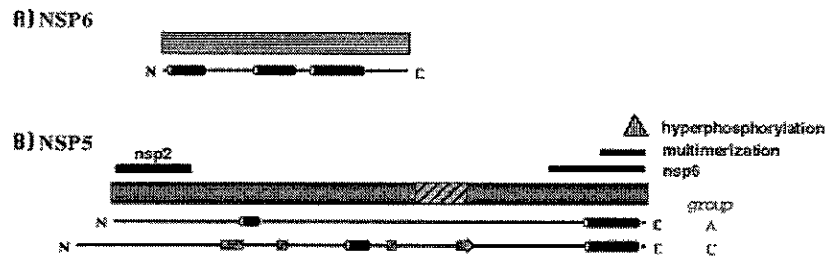


Fig. 6. Functional and structural domains of rotavirus NSP5 and NSP6 proteins. The prediction of the secondary structure for NSP6 (A) and NSP5 (B) proteins is shown below their diagrammatic representation. α -Helices are indicated by cylinders and β -strands by arrows. The structural domains shown are present in all sequences reported up to now (see Methods). In (B) the secondary structure predicted for group A and group C NSP5 proteins is shown; these are aligned at their C terminus, and amino acid insertions in NSP5 group C are represented by small boxes. NSP6 and NSP5 are placed according to the localization of their respective ORFs in rotavirus gene 11. The NSP5 variable region is indicated by a diagonally hatched box. The multimerization, interaction with NSP6, and putative NSP2 interaction domains are shown as bars above the diagrammatic representation of NSP5. The C-terminal 10 aa of NSP5 that are essential for hyperphosphorylation are indicated by a triangle.

to multimerize (Figs 2 and 3), was very poorly hyperphosphorylated (Fig. 4), despite the fact that all the serine and threonine residues of the protein, which have been shown to be the target for phosphorylation, are maintained in the mutant protein (Afrikanova *et al.*, 1996; Blackhall *et al.*, 1997). In fact, in the C-terminal 28 aa residues of NSP5 there are no serines or threonines, in contrast with the overall 22% content of these amino acids in the full-length protein, which suggests that the multimerization of NSP5 is not directly regulated by phosphorylation. Altogether these data strongly support the idea that NSP5 has a kinase activity responsible for its hyperphosphorylation, which would seem to depend on the multimerization of the protein. Several kinases, like protein tyrosine kinase, Janus kinases, type I and II receptors, c-raf and Tausled, require oligomerization for activation (Heldin, 1995; Klemm *et al.*, 1998; Roe *et al.*, 1997). Also, it has been shown that dimerization of serine/threonine kinases can be achieved by chemical ligands; which is in itself sufficient to regulate their activity (Clemons, 1999; Farrar *et al.*, 1996; Luo *et al.*, 1996).

An alternative explanation for the lack of hyperphosphorylation of mutant Δ C10 is that the 10 C-terminal aa of NSP5 are part of the catalytic core, with the consequential loss of the kinase function when these amino acids are deleted. However, mutant Δ C10 is still phosphorylated to forms equivalent to the 26 and 28 kDa species of wt NSP5, and all available evidence indicates that these forms are the result of an autocatalytic activity rather than the activity of a cellular enzyme (Afrikanova *et al.*, 1996, 1998; Blackhall *et al.*, 1997, 1998; Poncet *et al.*, 1997). Thus, these data suggest that NSP5 has indeed an autocatalytic activity, which, in order to generate the hyperphosphorylated species of the protein, needs to be in the form of a multimer. In this regard, it is of interest that the NSP5 mutants characterized by Fabbretti *et al.* (1999) only became hyperphosphorylated when the 10 C-terminal aa of NSP5 were present. Although in that work other mutants having this region were found not to be hyperphosphorylated,

the absence of activity of those mutant proteins could be explained by either the impairment of the protein kinase activity (mutants Δ d131–179) or the absence of the substrate region (mutants Δ N80 and Δ d34–80).

The hyperphosphorylation activity of NSP5 has been proposed to be up-regulated *in vivo* by the interaction of NSP2 with the N-terminal region of NSP5. Deletion of the 33 N-terminal aa of NSP5 was shown to induce hyperphosphorylation of the protein *in vivo*, and yielded an NSP5 protein insensitive to NSP2 activation (Afrikanova *et al.*, 1998). These observations are in agreement with our idea that multimerization of NSP5 is important for the hyperphosphorylation activity of the protein, since the N-terminal deletion mutants Δ N130 and Δ N162 were found to interact with the complete protein (by the yeast two-hybrid assay) more efficiently than with the wt NSP5. From our data it would seem that the hyperphosphorylation of NSP5 is enhanced by, rather than being strictly dependent on, the presence of NSP2.

Since the domains of NSP5 responsible for homomultimerization and for the interaction with NSP6 seem to partially overlap (Fig. 6), it is tempting to suggest that NSP6 could have a regulatory role in the multimerization of NSP5 and hence in the hyperphosphorylation activity of the protein. Additionally, it has been shown that the interaction between NSP2 and NSP5 is reinforced when NSP2 is bound to RNA (Poncet *et al.*, 1997), thus making an NSP2–NSP5–RNA complex susceptible to regulation by NSP6. It is not known, however, whether NSP5 simultaneously forms multimers and binds NSP6 (and NSP2), or if NSP6 associates with NSP5 and disrupts the multimers. The formation of alternative protein complexes could be modulated by the phosphorylation level of NSP5.

The regulatory role of NSP6 is supported by its low synthesis in rotavirus-infected cells. On the other hand, an ORF encoding NSP6 has not been found in the NSP5 gene of rotavirus group A strains Mc323 and Alabama or in rotavirus

group C strains. Thus, the proposed regulatory role of NSP6, or any other function it might have, would seem to be a fine tuning that can be somehow substituted. With regard to the NSP5–NSP6 interaction, it is of interest to note that gene 11 of rotavirus OSU encodes a short, 50 aa long NSP6, which is identical to the corresponding 50 N-terminal aa of the YM protein. OSU NSP6 is able to localize to viroplasm (Mattion *et al.*, 1991); thus, if the interaction of NSP6 with NSP5 directs the viroplasmic localization of NSP6, the domain of this protein responsible for the interaction with NSP5 should map to its N-terminal half.

As already recognized, the phosphorylation of NSP5 seems to be a complex process which might involve both viral and cellular kinases (Afrikanova *et al.*, 1996, 1998; Blackhall *et al.*, 1997, 1998; Poncet *et al.*, 1997). The addition of one or a few phosphates, to produce the 26 kDa NSP5 isoform, has been proposed to occur by an intramolecular low-rate autocatalytic event, although the specific attack of a cellular kinase has not been completely ruled out. This primary phosphorylation of NSP5 could make it more able to be phosphorylated on multiple serine/threonine residues to produce the 28 kDa species, as has been shown for other protein kinases (Johnson, 1993; Newton, 1997). Based on the lack of hyperphosphorylation (generation of the 30–34 kDa isoforms) of mutant Δ C10, in this study it is proposed that NSP5 multimerization is essential for this activity of the protein, which is consistent with the suggestion that dimerization brings two polypeptides together, promotes favourable orientations, and makes the intermolecular phosphorylation more efficient (Heldin, 1995; Klemm *et al.*, 1998). Apparently, at the end of the modification process of the protein, cellular kinases could still add more phosphates to NSP5 (Blackhall *et al.*, 1998). These cellular kinases could phosphorylate NSP5 only if NSP5 is in the form of a multimer. These processes might be regulated in infected cells by NSP6 and NSP2, as described above.

The function of NSP5 is not known, but it has been implicated in the formation of viroplasm-like structures, and in rotavirus genome RNA packaging, assortment and replication. Additional experiments are needed to define the role of this protein, and that of NSP6, in the replication cycle of rotaviruses.

We acknowledge the excellent technical assistance of Pedro Romero in the preparation of hyperimmune sera, and of Maria Elena Munguía for some of the plasmid constructions. We are also grateful to Elizabeth Mata and Graciela Cabeza for assistance with animal handling, and to John F. Hess (University of California, Davis, CA) and Bernard Moss (NIAID, NIH, Bethesda, MD) for kindly providing the human vimentin clones, and the vTF7-3 vaccinia virus, respectively. This work was partially supported by grants 75197-527106 from the Howard Hughes Medical Institute, G0012-N9607 from the National Council for Science and Technology-Mexico, IN207496 from DGAPA-UNAM, and from the Programme de Recherches Fondamentales en Microbiologie, Maladies Infectieuses et Parasitologie from MENRT, to D. Poncet

References

- Afrikanova, I., Miozzo, M. C., Giambiagi, S. & Burrone, O. (1996). Phosphorylation generates different forms of rotavirus NSP5. *Journal of General Virology* **77**, 2059–2065.
- Afrikanova, I., Fabbretti, E., Miozzo, M. C. & Burrone, O. R. (1998). Rotavirus NSP5 phosphorylation is up-regulated by interaction with NSP2. *Journal of General Virology* **79**, 2679–2686.
- Aponte, C., Poncet, D. & Cohen, J. (1996). Recovery and characterization of a replicase complex in rotavirus-infected cells by using a monoclonal antibody against NSP2. *Journal of Virology* **70**, 985–991.
- Blackhall, J., Fuentes, A., Hansen, K. & Magnusson, G. (1997). Serine protein kinase activity associated with rotavirus phosphoprotein NSP5. *Journal of Virology* **71**, 138–144.
- Blackhall, J., Munoz, M., Fuentes, A. & Magnusson, G. (1998). Analysis of rotavirus nonstructural protein NSP5 phosphorylation. *Journal of Virology* **72**, 6398–6405.
- Bremont, M., Chabanne-Vautherot, D. & Cohen, J. (1993). Sequence analysis of three non structural proteins of a porcine group C (Cowden strain) rotavirus. *Archives of Virology* **130**, 85–92.
- Clemons, P. A. (1999). Design and discovery of protein dimers. *Current Opinion in Chemical Biology* **3**, 112–115.
- Estes, M. K. & Cohen, J. (1989). Rotavirus gene structure and function. *Microbiology Review* **53**, 410–449.
- Fabbretti, E., Afrikanova, I., Vascotto, F. & Burrone, O. E. (1999). Two non-structural rotavirus proteins, NSP2 and NSP5, form viroplasm-like structures *in vivo*. *Journal of General Virology* **80**, 333–339.
- Farrar, M. A., Alberola-Ila, J. & Perlmutter, R. M. (1996). Activation of the raf-1 kinase cascade by coumermycin-induced dimerization. *Nature* **383**, 178–181.
- Frishman, D. & Argos, P. (1996). Incorporation of non-local interactions in protein secondary structure prediction from the amino acid sequence. *Protein Engineering* **9**, 133–142.
- Fritz-Wolf, K., Schnyder, T., Wallimann, T. & Wolfgang, K. (1996). Structure of mitochondrial creatine kinase. *Nature* **381**, 341–345.
- Fuerst, T. R., Niles, E. G., Studier, F. W. & Moss, B. (1986). Eukaryotic transient expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **83**, 8122–8126.
- Gallegos, C. O. & Patton, J. T. (1989). Characterization of rotavirus replication intermediates: a model for the assembly of single-shelled particles. *Virology* **172**, 616–627.
- González, S. A. & 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. & Arias, C. F. (1998). *In vivo* interactions among rotavirus nonstructural proteins. *Archives of Virology* **143**, 981–996.
- Heldin, C.-H. (1995). Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* **80**, 213–223.
- Johnson, L. N. (1993). The effects of phosphorylation on the structure and function of proteins. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **22**, 199–232.
- Kapikian, A. Z. & Chanock, R. M. (1996). Rotaviruses. In *Fields Virology*, pp. 1657–1708. Edited by B. N. Fields, D. N. Knipe & P. M. Howley. New York: Raven Press.
- Kattoura, M. D., Chen, X. & Patton, J. T. (1994). The rotavirus RNA-binding protein NS35 (NSP2) forms 10S multimers and interacts with the viral RNA polymerase. *Virology* **202**, 803–813.

- Klemm, J. D., Schreiber, S. L. & Crabtree, G. R. (1998). Dimerization as a regulatory mechanism in signal transduction. *Annual Review of Immunology* **16**, 569–592.
- Legrain, P., Dokhelar, M.-C. & Transy, C. (1994). Detection of protein–protein interactions using different vectors in the two-hybrid system. *Nucleic Acids Research* **22**, 3241–3242.
- López, S. & Arias, C. F. (1993). Protein NS26 is highly conserved among porcine rotavirus strains. *Nucleic Acids Research* **21**, 1042.
- López, S., Espinosa, R., Greenberg, H. B. & Arias, C. F. (1994). Mapping the subgroup epitopes of rotavirus protein VP6. *Virology* **204**, 153–162.
- Luo, Z., Tzivion, G., Belshaw, P. J., Vavvas, D., Marshall, M. & Avruch, J. (1996). Oligomerization activates c-Raf-1 through a Ras dependent mechanism. *Nature* **383**, 181–185.
- Mattion, N. M., Mitchell, D. B., Both, G. W. & Estes, M. K. (1991). Expression of rotavirus proteins encoded by alternative open reading frames of genome segment II. *Virology* **181**, 295–304.
- Mattion, N. M., Cohen, J. & Estes, M. K. (1994). The rotavirus proteins. In *Viral Infections of the Gastrointestinal Tract*, pp. 169–249. Edited by A. Kapikina. New York: Marcel Dekker.
- Newton, A. (1997). Regulation of protein kinase C. *Current Opinion in Cell Biology* **9**, 161–167.
- Patton, J. T. (1995). Structure and function of the rotavirus RNA-binding proteins. *Journal of General Virology* **76**, 2633–2644.
- Poncet, D., Lindenbaum, P., Lharidon, R. & Cohen, J. (1997). In vivo and in vitro phosphorylation of rotavirus NSP5 correlates with its localization in viroplasms. *Journal of Virology* **71**, 34–41.
- Prasad, B. V. & Chiu, W. (1994). Structure of rotavirus. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **185**, 9–29.
- Roe, J. L., Durfee, T., Zupan, J. R., Repetti, P. P., McLean, G. B. & Zambryski, P. C. (1997). TOSLED is a nuclear serine/threonine protein kinase that requires a coiled-coil region for oligomerization and catalytic activity. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 5838–5845.
- Rossi, F., Labourier, E., Forné, T., Divita, G., Derancourt, J., Riou, J. F., Antoine, E., Cathala, G., Brunel, C. & Tazi, J. (1996). Specific phosphorylation of SR proteins by mammalian DNA topoisomerase I. *Nature* **381**, 80–82.
- Suzuki, T. & Furukohri, T. (1994). Evolution of phosphagen kinase. Primary structure of glycoamine kinase and arginine kinase from invertebrates. *Journal of Molecular Biology* **237**, 353–357.
- Welch, S. K., Crawford, S. E. & Estes, M. K. (1989). Rotavirus SA11 genome segment II protein is a nonstructural phosphoprotein. *Journal of Virology* **63**, 3974–3982.
- Wu, J. Y., Zhou, Z. Y., Judd, A., Cartwright, C. A. & Robinson, W. S. (1990). The hepatitis B virus-encoded transcriptional transactivator hbx appears to be a novel protein serine/threonine kinase. *Cell* **63**, 687–695.

Received 4 August 1999; Accepted 10 November 1999

II) RESULTADOS ADICIONALES CORRESPONDIENTES A LOS OBJETIVOS 1, 2 Y 4.

1) Actividad de cinasa asociada con NSP5 nativa *in vitro*.

Para determinar si NSP5 tiene una actividad de cinasa intrínseca, una aproximación fue investigar si esta proteína se autofosforila *in vitro*. A partir de lisados de células epiteliales MA104 infectadas con el rotavirus YM, NSP5 se inmunoprecipitó con un suero monoespecífico anti-NSP5 y se incubó en un amortiguador de cinasa que contenía γ - ^{32}P -ATP. La incorporación de ^{32}P en NSP5 se determinó por SDS-PAGE y autoradiografía. NSP5 se fosforiló eficientemente en este ensayo, de tal modo que se pudieron observar las tres isoformas de NSP5 (Figura 7A, carril 2): la de 26 kDa, pobremente marcada; la de 28 kDa, que incorporó una mayor cantidad de ^{32}P , y la de 30-34 kDa, con una señal muy intensa. Este resultado es diferente a la relación de las isoformas de NSP5 que se producen *in vivo*, ya que en la proteína inmunoprecipitada de células MA104 infectadas con rotavirus y marcadas con ^{32}P , las isoformas de 26 y 28 kDa son más claramente visibles que las de 30-34 kDa (Figura 7B, carriles 1 y 2). El resultado del ensayo de fosforilación *in vitro* sugiere que una actividad de cinasa está asociada con NSP5. Además, puesto que en este ensayo las isoformas de 30-34 kDa incorporaron una mayor cantidad de ^{32}P , es probable que NSP2 (una proteína de 35 kDa, Tabla 1) esté coprecipitando con NSP5 (Figura 1 del artículo anexo; Poncet *et al.*, 1997), e influya positivamente sobre su fosforilación (Afrikanova *et al.*, 1998). Otra alternativa es que durante el procedimiento de inmunoprecipitación se eliminen fosfatasas, que defosforilan a NSP5 *in vivo* (Figura 4 del artículo anexo; Blackhall *et al.*, 1998, Fig. 4).

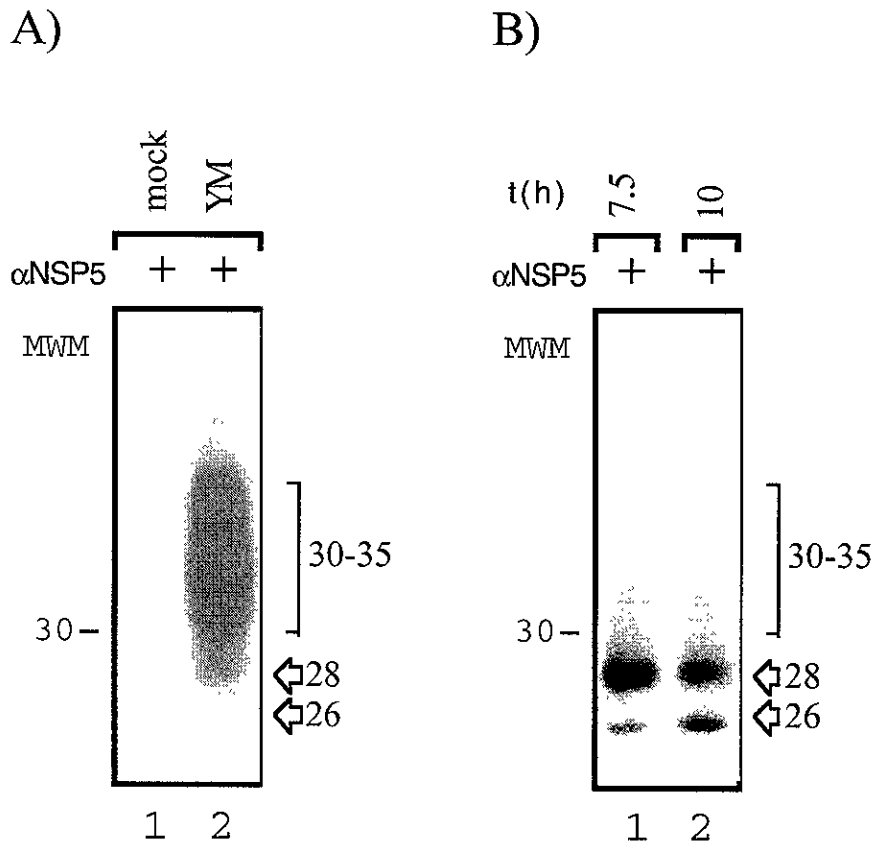


Figura 7. Fosforilación de NSP5 nativa *in vitro* e *in vivo*. Panel A. Células MA104 control (carril 1) e infectadas con el rotavirus YM (carril 2) se lisaron a 8 h postinfección y se trataron con un suero hiperinmune anti-NSP5. Los inmunoprecipitados unidos a las esferas de proteína A-Sepharosa se incubaron en un amortiguador de cinasa suplementado con γ - ^{32}P -ATP. Panel B. Células MA104 infectadas con el rotavirus YM se marcaron con ^{32}P , desde el inicio y hasta 7.5 y 10 h postinfección (carriles 1 y 2, respectivamente). A estos tiempos las células se lisaron y las proteínas se inmunoprecipitaron con el suero monoespecífico anti-NSP5. En ambos casos las proteínas se resolvieron por SDS-PAGE y autoradiografía. Los geles son al 11%.

II) Caracterización de la actividad de cinasa asociada con NSP5 *in vitro*.

Para determinar la especificidad de la actividad de cinasa asociada con NSP5, se probó su habilidad para fosforilar sustratos exógenos. En este sentido, NSP5 nativa en fase sólida (inmunoprecipitada y unida a la resina de Sepharosa) se incubó con caseína en el ensayo de cinasa *in vitro*. La caseína es una proteína que ha servido de sustrato de algunas serina/treonina cinasas eucariotes. En este ensayo la caseína se fosforiló eficientemente, observándose una banda intensamente marcada de 31 kDa tanto en el sobrenadante de la reacción de cinasa como en la proteína recobrada de la fase sólida (Fig. 8, carriles 2 y 3). En cambio, la albúmina sérica bovina (utilizada como control) no se fosforiló, mientras que las tres isoformas de NSP5 sí se marcaron con ^{32}P en esta reacción (Fig. 8, carriles 4 y 5). Por lo tanto, la actividad de cinasa asociada con NSP5 no es estrictamente selectiva, ya que puede fosforilar sustratos exógenos *in vitro*. Esto sugiere que una de las funciones de NSP5 en las células infectadas con rotavirus podría ser la de regular la actividad de algunas proteínas celulares por medio de su fosforilación.

Para tratar de identificar cinasas celulares que al coprecipitar con NSP5 pudieran estar involucradas en la fosforilación de esta proteína viral *in vitro*, se usaron algunos inhibidores de cinasas convencionales tales como esfingosina, estaurosporina, calfofina C, H7 y H89 (Hannun *et al.*, 1986; Tamaoki *et al.*, 1986; Rüegg y Burgess, 1989; Kobayashi *et al.*, 1989; Bruns, *et al.*, 1991; Hidaka *et al.*, 1984; Kawamoto y Hidaka, 1984; Schächtele *et al.*, 1988; Merrill, *et al.*, 1989; Chijiwa *et al.*, 1990). De cada uno de estos inhibidores se conocen algunas proteínas cinasas celulares blanco (Tabla 2). Otro interés relacionado con la identificación de inhibidores de la fosforilación de NSP5 radica en su uso potencial para bloquear esta actividad *in vivo*, lo que pudiera conducir a la determinación de la función de NSP5 en la replicación de los rotavirus. Los inhibidores se emplearon en el ensayo de fosforilación de NSP5 *in vitro* a las siguientes molaridades:

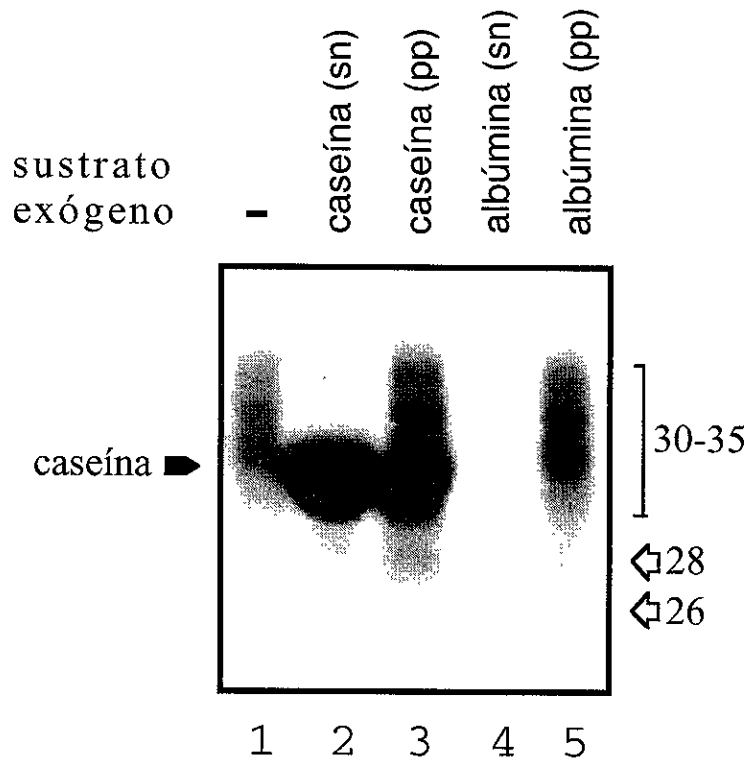


Figura 8. NSP5 nativa fosforila proteínas heterólogas *in vitro*. NSP5 inmunoprecipitada con un suero monoespecífico a partir de lisados de células infectadas con rotavirus se incubó con 100 μ g de caseína o de albúmina en las condiciones del ensayo de cinasa *in vitro*. Al término del ensayo se analizaron las proteínas fosforiladas en el sobrenadante (sn) y en el precipitado (pp), que tenía los complejos de NSP5-anticuerpo-proteína A-Sepharosa, por medio de SDS-PAGE y autoradiografía.

esfingosina (E), 10^{-8} a 10^{-6} ; estaurosporina (S), 10^{-7} a 10^{-5} ; calfostina C (C), 10^{-7} a 10^{-6} ; H7, 2×10^{-5} a 2×10^{-4} ; y H89, 10^{-7} a 10^{-5} . Esfingosina y calfostina C no tuvieron ningún efecto significativo sobre la fosforilación de NSP5; esto podría deberse a que se utilizaron a concentraciones de inhibición subóptimas para la mayoría de sus cinasas blanco (Tabla 2). En cambio, estaurosporina, H89 y H7 sí inhibieron la incorporación de fosfato, de tal modo que todas las isoformas de NSP5 se observaron disminuídas (Fig. 9). El efecto de

Tabla 2. Inhibidores de proteína cinasa utilizados en este estudio (IC₅₀ y/o K_i en μM).

<i>inhibidor</i>	<i>cinasa</i>							Ref.
	CaMK	CK-I	CK-II	MLCK	PKA	PKC	PKG	
estaurosporina	0.02	-	-	0.013	0.007	0.007	0.085	1,2,3
esfingosina	-	-	-	-	-	2.8		4
calfosfina C	-	-	-	>5.0	>50.0	0.05	>25.0	5,6
H7	-	100	-	97.0	3.0	6.0	5.8	7,8,9
H89	29.7	38.3	137	28.3	0.048	31.7	0.48	10

CaMK, cinasa dependiente de Ca²⁺/calmodulina; CK-I, caseína cinasa I; CK-II, caseína cinasa II; MLCK, cinasa de la cadena ligera de miosina, PKA, proteína cinasa dependiente de cAMP; PKC, proteína cinasa C; PKG, proteína cinasa dependiente de cGMP. ¹Rüegg y Burgess, 1989; ²Tamaoki *et al.*, 1986; ³Schächtele, 1988; ⁴Merrill, *et al.*, 1989; ⁵Bruns *et al.*, 1991; ⁶Kobayashi, *et al.*, 1989; ⁷Hidaka *et al.*, 1984; ⁸Schächtele, 1988; ⁹Kawamoto y Hidaka, 1984; ¹⁰Chijiwa *et al.*, 1990.

estaurosporina y H89 fue ligero; sin embargo, para estaurosporina se hizo evidente sólo a concentraciones de 10⁻⁵ μM (Fig. 9, carril 6), por lo que su participación en la disminución de la fosforilación de NSP5 pudiera representar un artefacto, ya que este compuesto inhibe específicamente a sus proteínas cinasas blanco en el rango de nM (Rüegg y Burgess, 1989). Durante el desarrollo de este trabajo, Blackhall y colaboradores (1998) también utilizaron a la estaurosporina para inhibir la fosforilación de NSP5 *in vitro* sin ningún éxito. La disminución de la fosforilación de NSP5 por H89 *in vitro* pudiera ser más severa si se utiliza a concentraciones molares mayores de 10⁻⁵, puesto que se han descrito enzimas como caseína cinasa II que tienen una K_i de 137 μM (Tabla 2). Por otro lado, H7 a una concentración de 2x10⁻⁴ M tuvo un efecto pronunciado, ya que la intensidad del marcaje radiactivo en NSP5 bajó cuando menos 5 veces en relación al control (Fig. 9, carril 12). Las proteínas cinasas que son inhibidas por H7 a una molaridad similar son la cinasa de la cadena ligera de miosina (97 μM) y caseína cinasa I (100 μM) (Hidaka *et al.*, 1984).

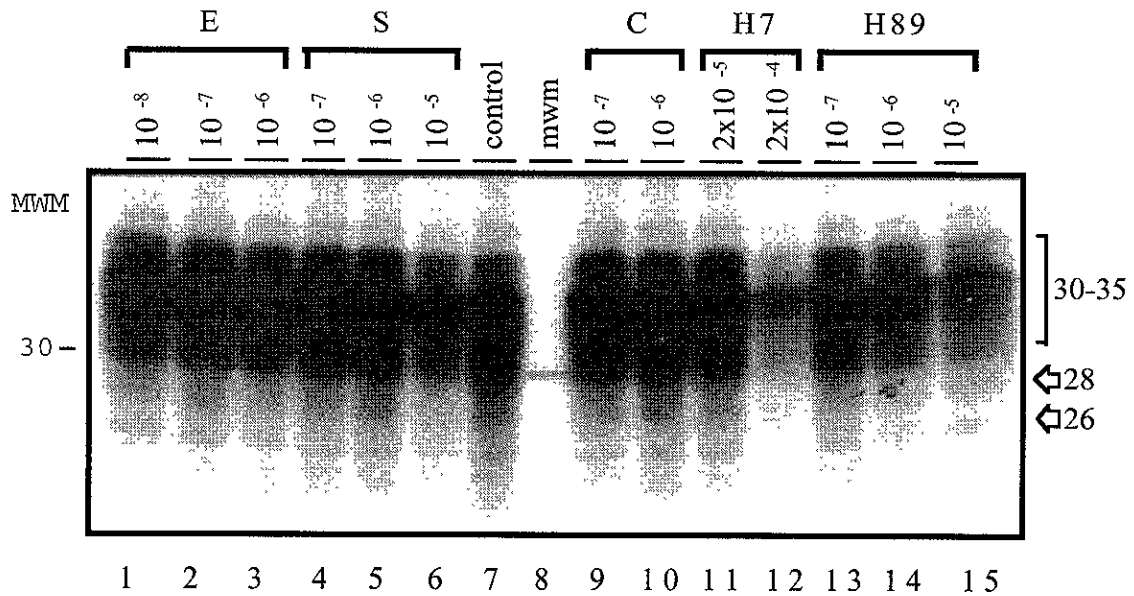


Figura 9. La fosforilación de NSP5 es inhibida drásticamente por H7 *in vitro*. NSP5 inmunoprecipitada con un suero mono-específico a partir de lisados de células MA104 infectadas con rotavirus se incubó en el ensayo de fosforilación *in vitro* en presencia de inhibidores de cinasas celulares, tales como esfingosina (E), estaurosporina (S), calfoestina C (C), H7 y H89. Los inhibidores se utilizaron a las concentraciones molares indicadas en la parte superior de la figura. Las proteínas se analizaron por SDS-PAGE y autoradiografía. El gel es al 11%.

3) Actividad de cinasa asociada con NSP5 recombinante *in vitro*.

Se ha descrito que las cinasas bacterianas son proteínas altamente específicas que no reconocen los sustratos de las cinasas de células eucariontes (Cozzone et al 1993). Por esta razón, para determinar si una proteína tiene actividad de cinasa intrínseca, una prueba comúnmente utilizada es expresar en bacteria a la proteína, aislada de las cinasas de las células eucariontes, y efectuar con la proteína recombinante ensayos de fosforilación *in vitro*. A partir del gene 11 del rotavirus YM se obtuvo el ORF de NSP5, y se clonó en los

vectores pGEX-4T2 y pET28a⁺, de donde se sintetiza la proteína en bacterias como fusión con glutatión S-transferasa (GST) o con residuos de histidina (6XHis), respectivamente. Para su análisis, en el caso de la fusión con GST, la NSP5 se inmunoprecipitó de lisados de bacterias con el suero hiperinmune anti-NSP5; mientras que para la fusión con 6XHis, la NSP5 se purificó de los extractos por medio de su afinidad a Ni²⁺-NTA-agarosa. Tanto la NSP5-GST como la NSP5-His, así como la mutante de NSP5 denominada ΔC10-His, que carece de los últimos 10 aminoácidos de NSP5 (7 de los cuales forma parte de los 20

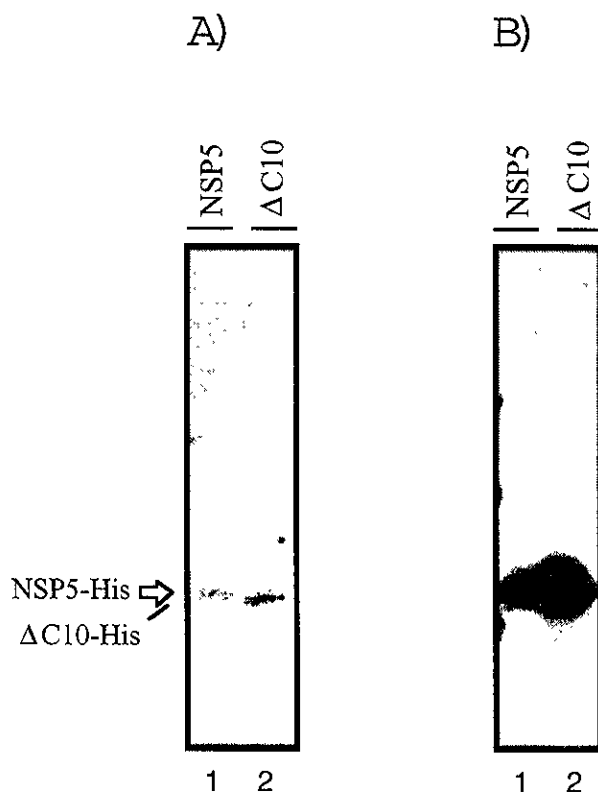


Figura 10. NSP5 recombinante se fosforila *in vitro*. Las proteínas NSP5 silvestre y la mutante ΔC10, en la que están ausentes los aa 187-197 de NSP5, se expresaron en bacteria como fusiones con residuos de histidina (6xHis). Las proteínas purificadas se incubaron en el ensayo de cinasa *in vitro*. Posteriormente, estas proteínas recombinantes se resolvieron por SDS-PAGE. En el panel A se muestra el gel (al 11%) con las proteínas teñidas con coomasie, y en en panel B, la autoradiografía del mismo gel.

aminoácidos del dominio con homología a las cinasas de fosfágeno), se fosforilaron en el ensayo de cinasa *in vitro* (Fig. 10B, carriles 1 y 2; Fig. 11, carril 1). Sin embargo, las proteínas recombinantes no exhibieron las tres isoformas fosforiladas; la única presente es equivalente a la de 26 kDa, de acuerdo con el peso molecular predicho para las fusiones. Para abundar sobre la posibilidad de que NSP5 sea blanco de cinasas celulares, se determinó si lisados de células MA104 aumentaban la fosforilación de NSP5-GST *in vitro*. Tanto la adición de extractos de células no infectadas como infectadas con el rotavirus YM resultó en un incremento significativo de la fosforilación de NSP5 (Fig. 11, carriles 2 y 3). No obstante, aún con estos lisados celulares tampoco se obtuvieron las isoformas hiperfosforiladas de NSP5-GST. De este modo, es probable que NSP5 tenga una actividad de cinasa intrínseca, utilizada para su propia fosforilación, en la cual también pueden estar involucradas cinasas celulares.

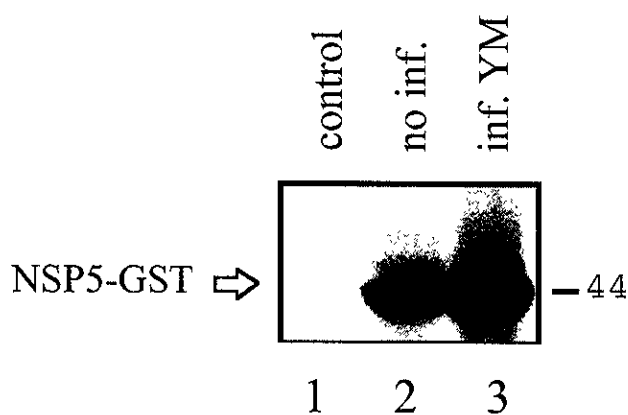


Figura 11. Proteínas de células eucariontes aumentan la fosforilación de NSP5 recombinante. NSP5 fusionada a GST se obtuvo de lisados de bacterias por inmunoprecipitación con el suero hiperinmune anti-NSP5. Más tarde la proteína se incubó en el ensayo de fosforilación *in vitro* sola (línea 1), o adicionada con extractos de células MA104 no infectadas (línea 2) o infectadas con el rotavirus YM (línea 3). Las proteínas se analizaron por SDS-PAGE y autoradiografía. El gel es al 11%.

4) Correlación entre la capacidad de multimerización e hiperfosforilación de NSP5 con la formación de pseudo-viroplasma.

Se ha descrito que la coexpresión de NSP5 y NSP2 en células MA104 produce partículas similares a viroplasma (pseudo-viroplasma, Fabbretti *et al.*, 1999). Para determinar si las propiedades de multimerización-hiperfosforilación de NSP5 son relevantes en el ensamblaje de estas estructuras, se coexpresaron en células MA104 la proteína NSP2 y la mutante de NSP5 $\Delta C10$, que no oligomeriza y no es eficientemente hiperfosforilada, utilizando el sistema transitorio de vaccinia-T7. La formación de pseudo-viroplasma en las células transfectadas se determinó por medio de inmunofluorescencia indirecta y microscopía confocal, como está descrito en González *et al.* (1998), con algunas modificaciones (ver métodos). Como ha sido reportado, NSP5 expresada sola no exhibe el patrón de distribución típico de las células infectadas con rotavirus (tinción vioplásmica, Figura 12, NSP5-NSP2), ya que en este caso la proteína se mostró como puntos diminutos que se localizan homogéneamente en todo el citoplasma (Figura 12, VV:NSP5; Poncet *et al.*, 1997; Blackhall *et al.*, 1998; Fabbretti *et al.*, 1999). Sin embargo, cuando NSP5 y NSP2 se coexpresaron en células MA104, las dos proteínas se distribuyeron en estructuras que morfológicamente son muy parecidas a los viroplasma (Figura 12, VV:NSP5-NSP2). En contraste, la coexpresión de la mutante $\Delta C10$ y NSP2 no promovió la formación de los pseudo-viroplasma (Figura 12, VV: $\Delta C10$ -NSP2). $\Delta C10$ transfectada sola se distribuyó homogéneamente en todo el citoplasma (Figura 12, $\Delta C10$), o en cambio, cuando se expresó en conjunción con NSP2, $\Delta C10$ tendió a agregarse en varias zonas discretas grandes, pero de manera desorganizada (Figura 12, VV: $\Delta C10$ -NSP2). Estos resultados

sugieren que el ensamblaje de los viroplasmos en las células infectadas con rotavirus puede depender de la capacidad de multimerización/hiperfosforilación de NSP5.

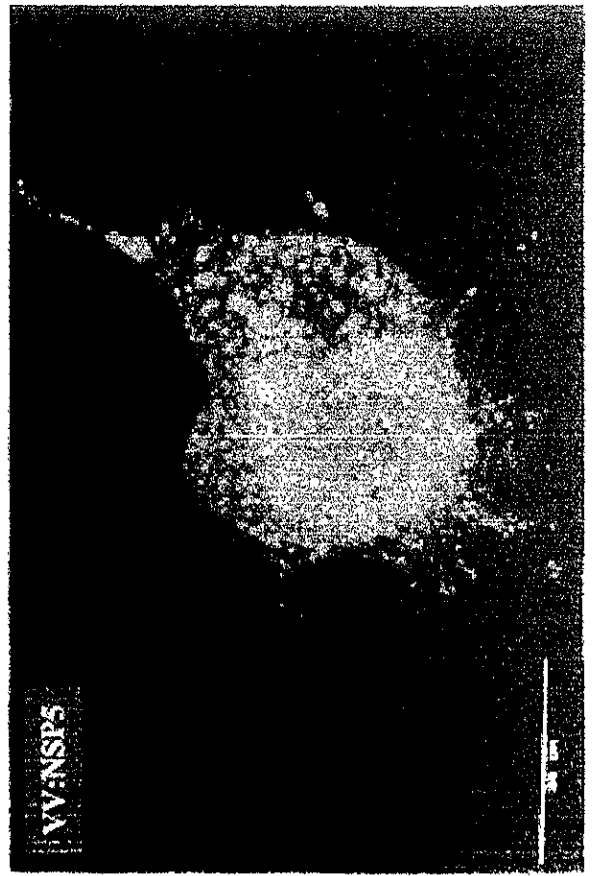
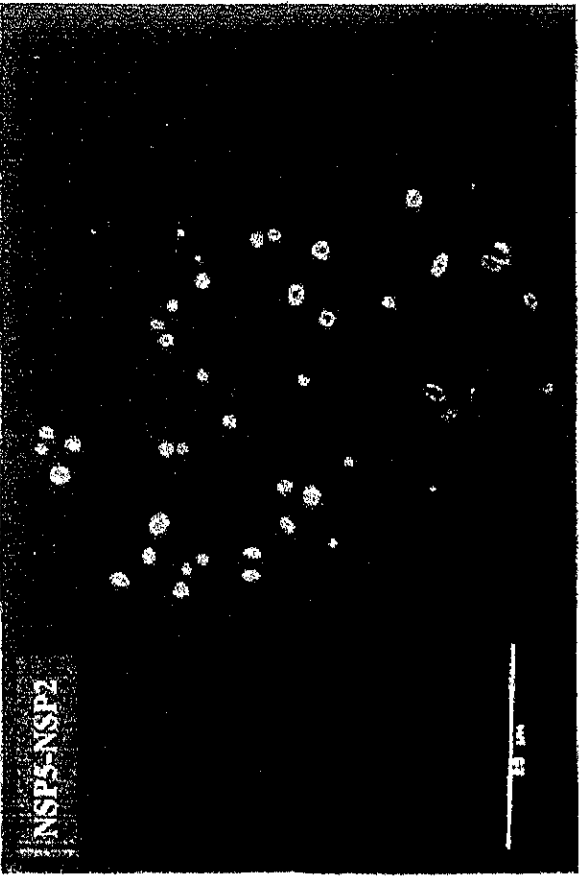
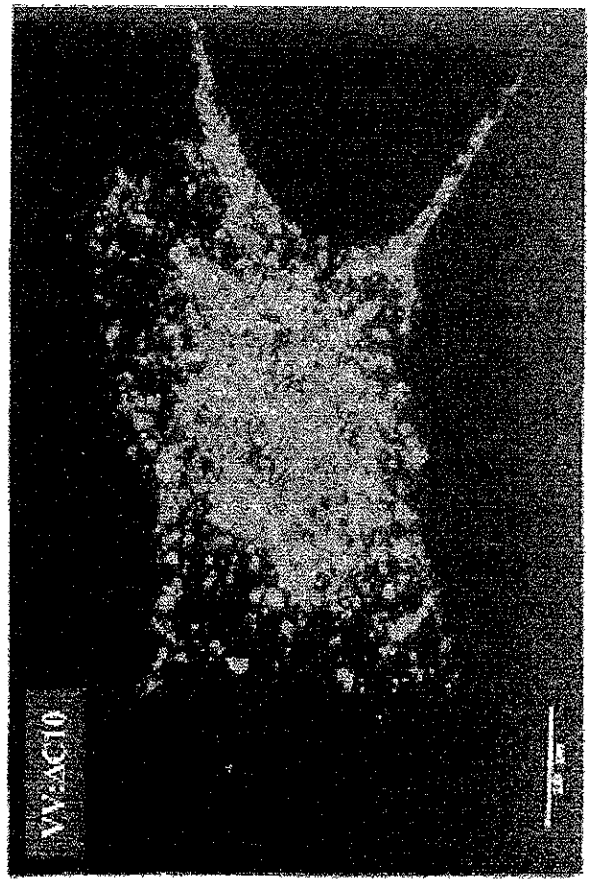
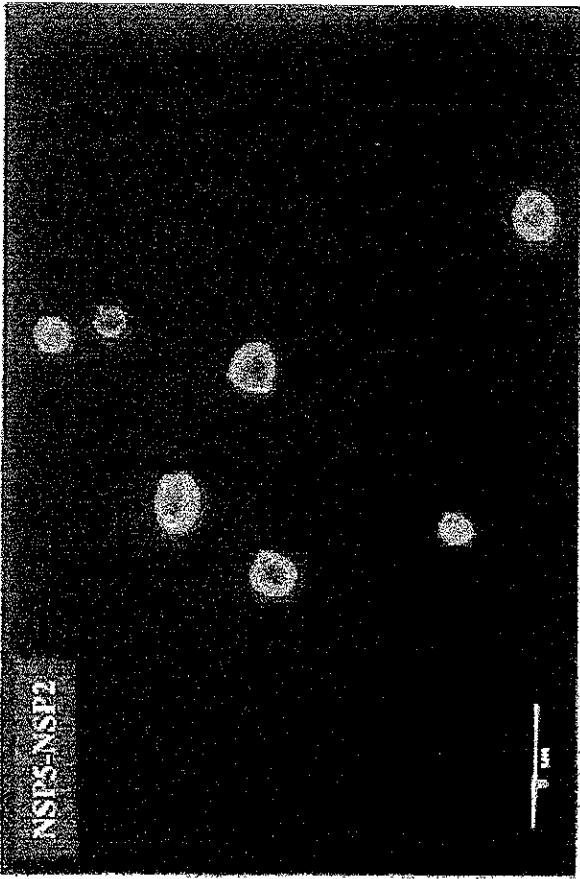
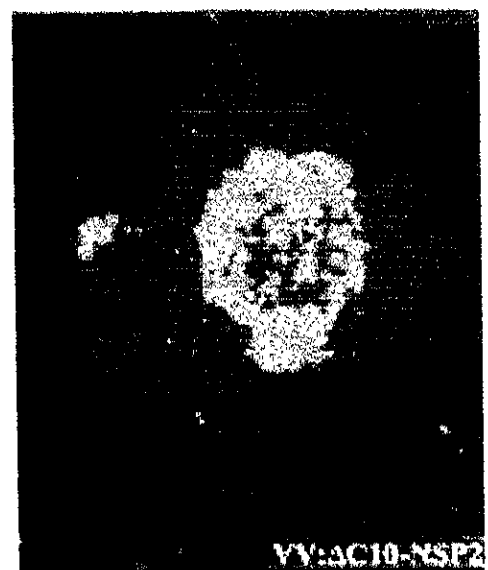
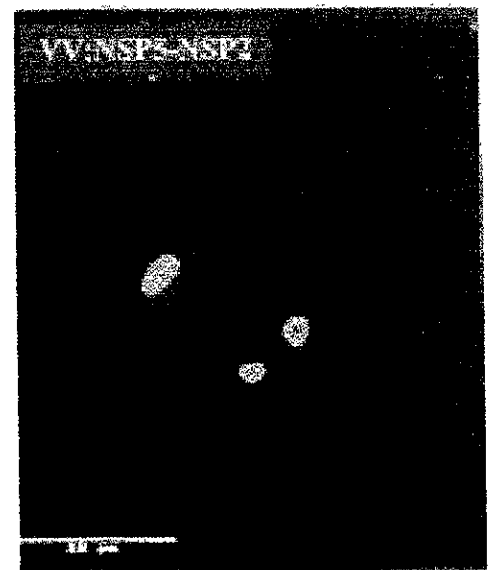
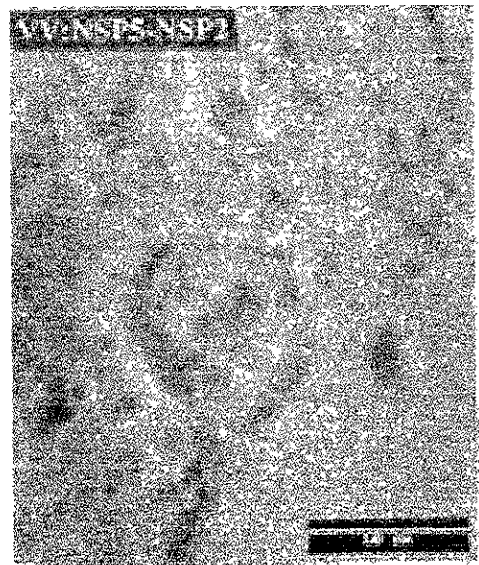


Figura 12. La mutante de NSP5 $\Delta C10$, que no multimeriza y es ineficiente en hiperfosforilación, tampoco puede formar pseudo-viroplasmata. Las proteínas NSP5, NSP2 y la mutante $\Delta C10$ se expresaron solas o en combinaciones en células MA104. La determinación de la localización de las proteínas y la formación de los pseudo-viroplasmata se hizo por medio de inmunofluorescencia indirecta y microscopía confocal. La tinción con fluoresceína (verde) identifica a NSP5, mientras que con rodamina (rojo) lo hace para NSP2; cuando estas dos proteínas colocalizan entonces la coloración es amarilla. Como control se utilizaron células infectadas con rotavirus YM; en NSP5-NSP2 se observan claramente los viroplasmata (aumentados 5 veces del lado derecho). VV=Expresión transitoria; en VV:NSP5-NSP2 note la formación de pseudo-viroplasmata (arriba está el contraste de fases de la célula examinada, con el núcleo en el centro). En VV: $\Delta C10$ -NSP2 se muestra la imagen de una suma de varios cortes ópticos analizados.



DISCUSSION

Asociaciones intermoleculares de NSP5.

Los rotavirus llevan a cabo su ciclo de replicación en el citoplasma de las células, en donde a partir de la infección se desarrollan los viroplasmos, que son estructuras electrodensas ricas en RNA y proteínas virales. En estas estructuras se efectúa la replicación del RNA y la morfogénesis del virión a través de partículas subvirales conocidas como RIs (Estes y Cohen, 1989; Patton, 1995). En los viroplasmos se localizan las proteínas estructurales VP1, VP2, VP3 y VP6, y las proteínas no-estructurales NSP2, NSP5 y NSP6 (Estes y Cohen, 1989; Patton *et al.*, 1995; González *et al.*, 1998). Se conocen algunas de las interacciones proteína-proteína específicas que se llevan a cabo en los viroplasmos: VP2 y VP6 se ensamblan para formar la doble capa de los VP6 RI, albergando a la polimerasa viral VP1 y la guaniltransferasa VP3. Sin embargo, existe poca información sobre el papel de las proteínas no-estructurales y las asociaciones intermoleculares que se establecen entre ellas o con las proteínas estructurales. Se ha reportado que NSP2 forma multímeros y se asocia con NSP5 y VP1 (Afrikanova *et al.*, 1998; Kattoura *et al.*, 1994; Poncet *et al.*, 1997; Taporewala *et al.*, 1999).

En este trabajo se identificaron algunas de las asociaciones intermoleculares de la proteína NSP5 de los rotavirus. Se pudo establecer que NSP5 forma multímeros *in vivo* e *in vitro* (Figuras 2 y 3 del artículo anexo). Este hallazgo se ha confirmado de manera independiente por dos grupos de investigación (Poncet *et al.*, 1997; Blackhall *et al.*, 1997). Sin embargo, al contrario de nuestra observación de que la multimerización de NSP5 se puede detectar específicamente por medio del sistema de los dos híbridos, el grupo del Dr. Cohen encontró que la proteína NSP5 del rotavirus bovino RF transactiva espontáneamente al gene reportero *HIS3* cuando se fusiona a GAL4-BD (Poncet *et al.*, 1997). Es probable que la proteína NSP5 de la cepa YM que utilizamos en nuestro sistema no exhibe dicha actividad como una consecuencia de sus diferencias aminoácidas con la proteína de la cepa RF, ya que entre ellas existe una identidad del 92%.

En este trabajo también se mapeó el dominio de homomultimerización de NSP5 *in vivo* e *in vitro* (Figuras 2 y 3 del artículo anexo). Este dominio se localizó en la región C-terminal de NSP5 entre los aa 178-197 (Figura 13). De hecho cuando se eliminaron los aa 188-197 de la proteína completa (mutante $\Delta C10$) NSP5 perdió su habilidad para multimerizar (Figuras 2 y 3 del artículo anexo). NSP5 es una proteína altamente conservada entre las cepas de los rotavirus del grupo A, siendo el dominio C-terminal uno de los que presenta menos sustituciones (Mattion *et al.*, 1994). Esta región es también la más conservada entre las proteínas NSP5 de los grupo A y C (Bremont *et al.*, 1993; Mattion *et al.*, 1994). Por ejemplo, la NSP5 de la cepa Bristol humana (grupo C) tiene una identidad total del 24% con la NSP5 de la cepa YM porcina (grupo A), mientras que la identidad entre los 28 aa C-terminales de estas dos proteínas es del 46%. Además la predicción de estructura secundaria de las NSP5 de los grupos A y C muestra que los 20 aa C-terminales de ambas proteínas tienen una estructura α -helicoidal (Figura 13). El hecho de que esta región incluye el dominio de homomultimerización de la NSP5 del grupo A sugiere que la NSP5 del grupo C también puede formar multímeros, e implica que esta propiedad es importante para la función de NSP5.

Nuestro análisis de la multimerización de NSP5 no distingue entre si NSP5 dimeriza o forma agregados moleculares más grandes. Para determinar el nivel de agregación de NSP5 será necesario emplear metodologías tales como la sedimentación en gradientes de sacarosa, que permitió conocer que la proteína NSP2 de los rotavirus se ensambla en multímeros (Taraporewala *et al.*, 1999).

La proteína NSP5 también se asocia con la proteína no-estructural NSP6 *in vivo* (Figuras 2 y 5 del artículo anexo). El dominio de NSP5 involucrado en la interacción con NSP6 se localiza entre los aa 163-197, por lo que se yuxtapone con el dominio de multimerización (Figura 13). Esto sugiere que NSP6 puede tener un papel regulatorio en la multimerización de NSP5.

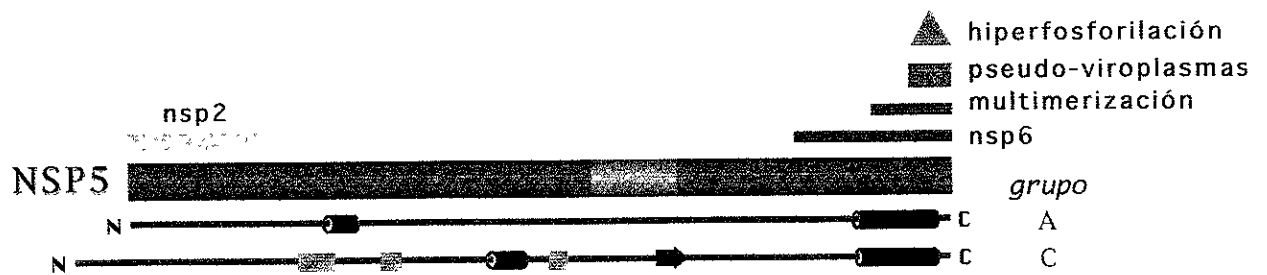


Figura 13. Dominios funcionales y estructurales de la proteína NSP5 de los rotavirus. Se muestra la predicción de estructura secundaria de las proteínas NSP5 de los rotavirus de los grupos A y C; éstas son alineadas con respecto a su extremo C-terminal, y las inserciones de aminoácidos en la NSP5 del grupo C son representadas por cajas pequeñas. Las hélices α son indicadas por cilindros y las hojas β por flechas. Los dominios estructurales mostrados están presentes en todas las secuencias reportadas actualmente. La región variable de la proteína está resaltada. Los dominios de multimerización, interacción con NSP6 y NSP2 aparente son mostrados como barras. Los 10 aa C-terminales de NSP5 que son esenciales para su hiperfosforilación y formación de pseudo-viroplasma son indicados.

Adicionalmente se ha reportado que la interacción entre NSP5 y NSP2 es más fuerte cuando NSP2 se une a RNA (Poncet *et al.*, 1997), por lo que todo el complejo NSP2-NSP5-RNA podría ser susceptible a regulación por NSP6. Sin embargo, aún no se conoce si NSP5 forma multímeros y se une a NSP6 simultáneamente (y NSP2), o si NSP6 se asocia con NSP5 y rompe los multímeros. Para determinar el efecto de NSP6 sobre la multimerización de NSP5 se podrían utilizar, entre otras estrategias, el ensayo de afinidad *in vitro* implementado en este trabajo, o bien el sistema de los dos híbridos con un vector modificado denominado pBridge (Clontech), que permite analizar la participación de tres proteínas en un complejo (Tirode *et al.*, 1997). Cabe destacar que la formación de complejos de proteína alternativos podría ser modulada por el nivel de fosforilación de NSP5 (Johnson, 1993).

El gene 11 del rotavirus OSU codifica a una NSP6 corta de tan solo 50 aa de longitud, que son idénticos a los correspondientes 50 aa N-terminales de la proteína de YM (que tiene 92 aa). La

NSP6 de OSU es capaz de localizarse en los viroplasmias (Mattion *et al.*, 1991); de este modo, si la asociación de NSP6 con NSP5 dirige la localización viroplásmica de NSP6, el dominio de esta proteína involucrado en la interacción con NSP5 debería de mapear en su mitad N-terminal.

Un aspecto relevante de la asociación de NSP5 con NSP6 es que sitúa a NSP6 como otro posible componente de los RIs. Se conocen las proteínas que constituyen a los RIs, entre las que se encuentra NSP5, pero NSP6 no se ha buscado. A través de su interacción con el dominio C-terminal de NSP5, NSP6 podría integrarse a los RIs e influir en los procesos asociados con la replicación del genoma de los rotavirus.

Por otra parte, los viroplasmias en las células infectadas con rotavirus preferentemente están adosados a la membrana del RE (González *et al.*, 2000), por lo que es probable que se establezcan asociaciones específicas entre las proteínas viroplásmicas y algunas proteínas celulares, que podrían servir como los centros de nucleación para el ensamblaje y la localización de estas estructuras virales. Sin embargo, cuando utilizamos la proteína NSP5 de YM fusionada a GAL4-BD para identificar interacciones con proteínas celulares, las cuales se sintetizaban como fusión con GAL4-AD a partir de una biblioteca de cDNA de células MA104, no obtuvimos ninguna clona positiva al rastrear la biblioteca de cDNA completa (1×10^6 clonas independientes) por medio del sistema de los dos híbridos. En cambio, esta misma biblioteca de cDNA rindió varias clonas positivas cuando empleamos a la vimentina humana como un control (como era de esperarse, las clonas contenían fragmentos del cDNA de vimentina). Blackhall y colaboradores (1997) tampoco pudieron identificar ninguna proteína celular que se asociara con NSP5-GST por medio de un ensayo de afinidad. Si se establecen interacciones específicas entre NSP5 y proteínas celulares es probable que dichas interacciones sean débiles o transitorias, en cuyo caso para hacer la identificación se podría emplear un sistema de los dos híbridos con mayor sensibilidad. También es posible que esta asociación dependa de que NSP5 esté formando un complejo con otras proteínas virales tales como NSP2, ya que, por ejemplo, NSP5 y NSP2 se localizan en todo el citoplasma

cuando son expresadas solas en células MA104, pero se redistribuyen en estructuras perinucleares similares a viroplasmos si son expresadas juntas (Figura 12; Fabbretti *et al.*, 1999).

En resumen, las asociaciones intermoleculares de NSP5 identificadas hasta este momento son con ella misma, formando multímeros, y con las proteínas no-estructurales NSP6 y NSP2 (Figura 13). La región C-terminal de NSP5 es responsable de la multimerización y de la interacción con NSP6, cuyos dominios se yuxtaponen, introduciendo así la posibilidad de que la multimerización de NSP5 y la actividad del complejo NSP5-NSP2-RNA esté regulada por NSP6. El dominio N-terminal de NSP5 aparentemente participa en la interacción con NSP2, ya que mutantes de NSP5 que carecen de los aa 1-33 no son sensibles al efecto estimulador de NSP2 sobre su hiperfosforilación y son incapaces de formar pseudo-viroplasmos (Afrikanova *et al.*, 1998; Fabbretti *et al.*, 1999); sin embargo, aún no existen evidencias directas de la unión de la región N-terminal de NSP5 con NSP2. Adicionalmente se ha propuesto que NSP5 también interacciona con VP1, ya que cuando se utilizó un entrecruzador permeable denominado dithiobis (succinimidylpropionato) ó DSP en células infectadas con rotavirus se obtuvieron inmunoprecipitados (con un suero específico anti-NSP5) que contenían complejos de las proteínas NSP5, NSP2 y VP1 (Afrikanova *et al.*, 1998). No obstante, es posible que VP1 se asocie a estos complejos a través de NSP2, con quien se ha demostrado que sí tiene una interacción (Kattoura *et al.*, 1992). Será interesante determinar si NSP5 se asocia directamente con VP1, lo que podría sugerir que NSP5 regula la polimerización de los segmentos de RNA.

La asociación de NSP5 con NSP2 y la adición de NSP6 para formar complejos similares a los que se ensamblan en los pseudo-viroplasmos podría ser un requisito para el establecimiento del “core” RI, que son partículas subvirales con un núcleo compuesto por las proteínas virales VP1, VP2 y VP3 (Gallegos y Patton, 1989). Estos dos tipos de complejos podrían llegar a fusionarse temporalmente a través de la interacción entre VP1 y NSP2, y posiblemente NSP5, para dar origen a un “core” RI funcional. Sin embargo, se desconoce aún el efecto de los agregados de

NSP5, NSP2 y NSP6 en actividades tales como la selección, el empaquetamiento y la replicación de los segmentos de RNA que se llevan a cabo en los “core” RIs.

Actividades catalíticas que inciden sobre la fosforilación de NSP5.

Las cinasas convencionales forman una familia de proteínas constuída por más de 200 miembros, que catalizan la transferencia del γ -fosfato del ATP (ó GTP) al grupo alcohol de un residuo de serina/threonina, o al grupo fenólico de un residuo de tirosina, formando en ambos casos monoesteres de fosfato. Se caracterizan por tener un dominio catalítico de 250-300 aminoácidos que está muy conservado (Taylor *et al.*, 1992; Hanks y Hunter, 1995). En una familia aparte están ubicadas las fosfágeno cinasas, que presentan una estructura primaria y un plegamiento diferente al de las cinasas convencionales. Estas enzimas catalizan la transferencia reversible del γ -fosfato del ATP a compuestos de guanidina tales como creatinina, glicociamina, tauromicina, lombricina y arginina. Al compuesto de guanidina fosforilado se le denomina fosfágeno (Kenyon y Reed, 1986; Susuki y Furukohri, 1994; Fritz-Wolf *et al.*, 1996).

Se ha sugerido que NSP5 tiene una actividad de proteína cinasa de serina y de treonina por medio de la cual se autofosforila (Afrikanova *et al.*, 1996; Blackhall *et al.*, 1997; Poncet *et al.*, 1997). Sin embargo, el análisis de comparación de NSP5, a nivel de nucleótidos o de aminoácidos, con las secuencias almacenadas en los bancos de datos (Genbank, Swiss-Prot), utilizando BLAST o FASTA, no arrojó resultados significativos de homología con ninguna proteína. Tampoco hubo similitud cuando se hizo la comparación directa entre NSP5 y proteína cinasa C, un prototipo de las cinasas convencionales.

No obstante, se ha reportado que NSP5 tiene una región en su extremo carboxilo (aminoácidos 175 a 195) con homología a las fosfógeno cinasas. Diferentes razones hacen suponer que NSP5 no pertenece a esta familia de proteínas: i) las fosfógeno cinasas son proteínas de 350 a 724 residuos (Susuki y Furukohri, 1994; Susuki *et al.* 1998) y la región con homología a NSP5 abarca solamente 20 aa; ii) esta región de las fosfógeno cinasas se localiza en una zona variable y no parece tener un papel relevante en las actividades catalíticas, de unión a ATP y de reconocimiento del sustrato (Fritz-Wolf *et al.*, 1996); iii) cuando se eliminó un fragmento de 10 aa o la totalidad del dominio de NSP5 con homología a las creatinina cinasas no hubo una pérdida en la fosforilación de esta proteína *in vitro* o *in vivo* (Figura 4 del artículo anexo; Figura 10B, Fabbretti *et al.*, 1999).

A pesar de que NSP5 no está relacionada con las familias de cinasas conocidas, y de que la remoción del sitio aparente de unión a ATP de esta proteína no modificó su fosforilación (Fabbretti *et al.*, 1999), en este trabajo presentamos resultados que sugieren que NSP5 puede tener una actividad de cinasa intrínseca: i) la proteína de células MA104 infectadas con rotavirus recuperada de los lisados por inmunoprecipitación con un suero monoespecífico anti-NSP5 (González *et al.*, 1998) se fosforila *in vitro* (Figura 7A); ii) NSP5 expresada sola en células MA104 se fosforila *in vivo* (Figura 4 del artículo anexo); y iii) NSP5 recombinante como fusión con GST o con 6xHis se fosforila *in vitro* (Figuras 10B y 11). Se han reportado cinasas celulares y virales que no poseen los motivos canónicos de las cinasas de serina/treonina (Rossi *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1990); de este modo, NSP5 podría pertenecer a este grupo de cinasas “no convencionales”.

Aún cuando se obtuvo la fosforilación de NSP5 recombinante *in vitro*, no se observaron las isoformas equivalentes a las de 28 kDa y 30-34 kDa. Una posibilidad es que la proteína del rotavirus expresada en bacteria no adquiere el plegamiento nativo, por lo que los residuos de Ser y Thr que son utilizados en la generación de las isoformas de mayor peso no son presentados adecuadamente para su fosforilación. Sin embargo, debido a que una NSP5 recombinante se

empleó en los ensayos de afinidad para demostrar multimerización, pareciera ser que el plegamiento de esta proteína en dominios funcionales sí se puede dar.

La NSP5 sintetizada en células infectadas es glicosilada con residuos de N-acetilglucosamina unidos en enlaces de tipo O (González y Burrone, 1991). Aún no se ha determinado el efecto de los residuos de azúcar sobre las propiedades de NSP5. Se ha descrito que los residuos que se fosforilan en una proteína son los mismos que se emplean en la o-glicosilación. Puesto que existe una relación recíproca entre estas dos modificaciones, se ha propuesto que podrían tener una función inversa (Hart, 1997). Las bacterias efectúan la o-glicosilación sobre residuos de Ser o Thr en algunas de sus proteínas, pero no llevaron a cabo esta modificación en la proteína p62, un componente del complejo de poro nuclear, que normalmente está o-glicosilada con N-acetilglucosamina en células eucariontes (Plummer *et al.*, 1995; Dobos *et al.*, 1996; Lubas *et al.*, 1995). No se conoce si la NSP5 sintetizada en bacterias está o-glicosilada. La ausencia de azúcares en NSP5 pudiera afectar su capacidad de fosforilación.

Otro de los argumentos para justificar la ausencia de hiperfosforilación de NSP5 recombinante *in vitro* es que esta proteína sirve como blanco de fosfatasa bacterianas contaminantes (Cozzone, 1993; Leonard *et al.*, 1998). La NSP5 recombinante podría ser capaz de autofosforilarse para producir las isoformas equivalentes a 26, 28 y 30-34 kDa, pero la mayor parte de los fosfatos incorporados serían removidos por fosfatasas muy activas. Algunos fosfatos de NSP5 aparentemente no son accesibles a la acción de las fosfatasas bacterianas *in vitro* (Afrikanova *et al.*, 1996) Esto explicaría porqué a pesar de un posible ataque de las fosfatasas bacterianas contaminantes se obtiene una NSP5 recombinante fosforilada *in vitro* que es equivalente a la isoforma de 26 kDa.

La identificación de los aminoácidos fosforilados en la proteína NSP5 recombinante o en la isoforma de 26 kDa derivada de células eucariontes podría ser útil para conocer el papel de estas modificaciones en la actividad de cinasa aparente de NSP5, y en la generación de las isoformas hiperfosforiladas. Es probable que al menos tres fosfatos se incorporen a la isoforma de 26 kDa,

ya que por electroforesis en doble dimensión esta proteína se resolvió en tres manchas fosforiladas con puntos isoeléctricos de 4.6 a 6.0 (Blackhall *et al.*, 1997).

En los ensayos de actividad catalítica *in vitro* con las diferentes NSP5 recombinantes no se puede descartar que su fosforilación se deba a la acción de una cinasa exógena. A pesar de que se ha descrito que las cinasas bacterianas son proteínas altamente específicas, que en general no reconocen a los sustratos de las cinasas eucariontes, existen algunas excepciones, como es el caso de las cinasas de *S. pyogenes*, que son capaces de fosforilar histonas y protaminas (Cozzone *et al.*, 1993). El análisis de las secuencias de los genomas de bacterias y arqueobacterias ha identificado cuatro familias potenciales de cinasas, además de la familia Pkn2, la cual incluye a las cinasas bacterianas que han sido aisladas. Entre estas familias se encuentra ABC1, que agrupa cinasas de bacteria y eucariontes, lo que aumentaría la posibilidad de un reconocimiento cruzado de los sustratos de fosforilación entre las cinasas de los dos tipos de organismos (Leonard *et al.*, 1998).

Uno de los sustratos que no es fosforilado por las cinasas bacterianas es caseína (Cozzone *et al.*, 1993). De acuerdo con los resultados de fosforilación de sustratos exógenos, la proteína NSP5 inmunoprecipitada de células infectadas pudo fosforilar caseína (Figura 8). Sería interesante determinar si la preparación de NSP5 recombinante también puede fosforilar caseína; en caso de que esto ocurra, podría ser sugerente de que NSP5 tiene una actividad de cinasa intrínseca. Estos experimentos se están llevando a cabo actualmente en nuestro laboratorio.

Se han reportado proteínas con actividad de cinasa que no tienen homología con las cinasas convencionales, ni presentan la secuencia consenso de unión a ATP, $\text{LGXGXXG}_{(A,S)}\text{V}$ (Taylor *et al.*, 1992; Hanks y Hunter, 1995). Este es el caso de hbx del virus de hepatitis B y la DNA topoisomerasa I de células HeLa. La demostración clara de que estas proteínas tienen actividad de cinasa intrínseca provino de dos tipos de experimentos: a) la proteína expresada en bacteria fue altamente purificada y marcada con p-fluorosulfonyl [^{14}C]-benzoyl-5'adenosine (^{14}C -FSBA), un análogo de afinidad de ATP que se une irreversiblemente y modifica a los sitios de unión de ATP de las proteínas cinasas; b) la proteína fue sometida a electroforesis en gel de poliacrilamida con

SDS, de donde fue eluída o transferida a membranas, y después de renaturalización se observó que aún era capaz de autofosforilarse o de fosforilar sustratos exógenos (Wu *et al.*, 1990; Rossi *et al.*, 1996). Este tipo de experimentos también podrán auxiliar en la determinación de NSP5 como una cinasa.

Otros miembros de la familia *Reoviridae*, como los orbivirus, los reovirus y los fitoreovirus, poseen proteínas fosforiladas, de las que se desconoce su función (Huisman *et al.*, 1987; Thomas *et al.*, 1990; Theron *et al.*, 1994; Susuki *et al.*, 1999a). Es relevante que la proteína Pns12 del virus del arroz enano (un fitoreovirus), que es rica en residuos de Ser y Thr, es fosforilada *in vitro* por extractos de células de plantas, animales e insectos, pero no por extractos de *E. coli* (Susuki *et al.*, 1999a). Pns12 tampoco se autofosforila *in vitro*, por lo que aparentemente no posee una actividad de cinasa intrínseca. Pns12, al igual que NSP5, se distribuye en estructuras viroplásmicas, sin embargo, la identidad entre estas dos proteínas es de tan solo el 26%, por lo que no es claro si Pns12 y NSP5 podrían cumplir funciones equivalentes.

Ante la posibilidad de que NSP5 sea una cinasa que puede fosforilar sustratos heterólogos, es probable que una de las funciones de NSP5 sea la de fosforilar proteínas celulares *in vivo*. Estas proteínas blanco pudieran ser intermediarias en las cascadas de señales intracelulares. La activación por NSP5 de una de éstas cascadas conduciría a la alteración de funciones celulares o a la expresión de algunos genes (Hunter, 2000). En células MA104 los rotavirus inducen la expresión de las proteínas de choque térmico hsc70, BIP y endoplasmína (F. Hernández Terán, comunicación personal; Xu *et al.*, 1998). NSP5 podría estar involucrada en la activación de la vía de inducción de estas proteínas.

De gran interés resultó el uso del inhibidor H7, ya que se obtuvo una disminución significativa en la fosforilación de NSP5 *in vitro* (Figura 9, carril 12). De acuerdo con su concentración molar, H7 pueden inhibir selectivamente diferentes cinasas celulares (Hidaka *et al.*, 1984). Por ejemplo, H7 tiene una K_i de 97 μM para la cinasa de la cadena ligera de miosina, y una

K_i de 100 μM para caseína cinasa I (Tabla 2). H7 inhibió más del 80 % la fosforilación de NSP5 a 200 μM . Sin embargo, es poco probable que la cinasa de la cadena ligera de miosina pueda fosforilar a NSP5 en el ensayo de cinasa *in vitro*, debido a que estaurosporina, que a las concentraciones molares utilizadas también exhibiría un efecto inhibitorio sobre esa cinasa, y en consecuencia sobre la fosforilación de NSP5, no lo hizo (Figura 9). El empleo del inhibidor H89 a concentraciones molares de 10^4 o más altas podría ayudar a la determinación de si caseína cinasa I contribuye a la fosforilación de NSP5 *in vitro*.

Puesto que H7 disminuyó el marcaje con fósforo de las tres isoformas de NSP5, es probable que la actividad de cinasa afectada por este inhibidor incida sobre un punto inicial limitante que influye la fosforilación de las isoformas de mayor peso. La actividad de cinasa inhibida por H7 en las fosforilaciones de NSP5 *in vitro* pudiera ser de una proteína celular, o bien, de la misma NSP5. El efecto de H7 sobre la fosforilación *in vitro* de la NSP5 recombinante podría ayudar a resolver esta pregunta.

El uso de los inhibidores en los ensayos de fosforilación *in vitro* de NSP5 no ha permitido identificar ninguna cinasa celular que pudiera estar actuando sobre esta proteína. Sin embargo, el aumento en la fosforilación de NSP5 recombinante *in vitro* por la adición de extractos de células MA104 no infectadas (Fig. 11), fuertemente sugiere que cinasas celulares actúan sobre NSP5 *in vivo*.

A partir de la determinación de que NSP5 tiene sitios de fosforilación potenciales para proteína cinasa C y caseína cinasa II (Blackhall *et al.*, 1997), el grupo de Magnusson utilizó los inhibidores estaurosporina y 5,6-dichloro-1- β -D-ribofuranosyl benzimidazole (DRB) en células infectadas con rotavirus para determinar el efecto de estas cinasas sobre la fosforilación de NSP5. Mientras que con DRB no se observó ninguna alteración, con estaurosporina el efecto fue

moderado, por lo que la posible actuación de caseína cinasa II y de proteína cinasa C sobre la fosforilación de NSP5 es muy limitada *in vivo*.

Se ha reportado que H7 tiene un efecto sobre la fosforilación de proteínas *in vivo* y sobre la activación de funciones biológicas (Kawamoto y Hidaka, 1994; Schächtele *et al.*, 1988), por lo que sería de gran interés determinar el efecto de este inhibidor sobre la fosforilación de NSP5 en células infectadas, y en la replicación de los rotavirus. Experimentos preliminares de nuestro laboratorio sugieren que H7 *in vivo* disminuye la fosforilación de NSP5 aproximadamente cuatro veces y reduce la producción de progenie viral de 10 a 100 veces (T. López *et al.*, datos no publicados).

En conclusión, el nivel de fosforilación de NSP5 que se mantiene durante la replicación de los rotavirus puede ser el resultado de un balance entre actividades catalíticas que adicionan y remueven fosfatos. Las evidencias disponibles en este momento sugieren que algunos fosfatos son incorporados a NSP5 por medio de una actividad autocatalítica intrínseca; cinasas celulares aún no identificadas también pueden contribuir a la fosforilación de esta proteína. Con base en la observación de que el ácido okadaico, un inhibidor general de fosfatasas (Cohen *et al.*, 1990), favorece la formación de las especies hiperfosforiladas de NSP5 en células infectadas con rotavirus (Figura 4 del artículo anexo; Blackhall *et al.*, 1998), es probable que estas enzimas regulen la abundancia relativa de las isoformas de NSP5. El efecto del ácido okadaico es más evidente en células que expresan la proteína NSP5 sola, en donde las isoformas hiperfosforiladas están menos representadas que en las células infectadas con rotavirus; en este sentido se ha propuesto que el viroplasma puede actuar como una barrera que disminuye el ataque de las fosfatasas sobre NSP5 (Blackhall *et al.*, 1998).

Regulación de la hiperfosforilación de NSP5 por asociaciones intermoleculares.

La multimerización parece ser una propiedad muy importante para que la proteína NSP5 lleve a cabo su función en la replicación de los rotavirus, ya que el dominio involucrado en esta actividad se encuentra conservado a los niveles de estructura primaria y secundaria entre las NSP5 de los rotavirus de los grupos A y C (Figura 13; Bremont *et al.*, 1993; Mattion *et al.*, 1994). En este trabajo examinamos si la habilidad para multimerizar podría afectar una de las propiedades más evidentes de esta proteína, que es su fosforilación en diferentes isoformas. Los resultados mostraron que la mutante $\Delta C10$, que no multimeriza, también se hiperfosforila muy pobremente (Figura 4 del artículo anexo), a pesar de que todos los residuos de Ser y Thr presentes en la proteína silvestre (que son el blanco de la fosforilación) se mantuvieron en la proteína mutante (Afrikanova *et al.*, 1996; Blackhall *et al.*, 1997). De hecho, en los 28 residuos C-terminales de NSP5 no hay Ser o Thr, en contraste con un contenido total del 22% de estos aa en la proteína completa; por lo tanto, la multimerización de NSP5 no parece ser regulada directamente por su fosforilación. Tomados en conjunto estos datos sugieren fuertemente que NSP5 tiene una actividad de cinasa responsable de su hiperfosforilación, la cual puede depender de la multimerización de la proteína. Varias cinasas, al igual que las proteínas cinasas de tirosina, la cinasa Janus, los receptores tipo I y II, c-raf y Tousled, requieren de multimerización para su activación (Heldin, 1995; Klemm *et al.*, 1998; Roe *et al.*, 1997). Esto es consistente con la idea de que la multimerización trae varios polipéptidos juntos, promueve orientaciones favorables, y hace más eficiente la fosforilación intermolecular (Heldin, 1995; Klemm *et al.*, 1998; Jiang y Hunter, 1999).

Una explicación alternativa para la ausencia de hiperfosforilación en la mutante $\Delta C10$ es que los 10 aa C-terminales de NSP5 son parte del núcleo catalítico, con la consecuente pérdida de la

función de cinasa si estos aa son deletados. Sin embargo, la mutante $\Delta C10$ aún se fosforila en las isoformas equivalentes a las especies de 26 y 28 kDa de la proteína NSP5 silvestre (Figura 4 del artículo anexo); como ya se discutió, todas las evidencias disponibles sugieren que estas isoformas son el resultado de una actividad autocatalítica más que de la actividad de una enzima celular. Por lo tanto, es muy probable que NSP5 tenga una actividad de cinasa intrínseca, la cual para generar las especies hiperfosforiladas de la proteína necesita estar en la forma de un multímero. Con relación a esto, es de interés que las mutantes de NSP5 caracterizadas por Fabbretti *et al.* (1999) solamente llegan a ser fosforiladas cuando los 10 aa C-terminales de NSP5 están presentes. Aunque en ese trabajo se encontraron otras mutantes que aún teniendo esta región no se hiperfosforilaron, la ausencia de dicha actividad pudiera ser explicada ya sea por un impedimento de la actividad de cinasa (mutantes $\Delta d131-179$) o por la ausencia de la región de sustrato (mutante $\Delta N80$ y $\Delta d34-80$).

La actividad de hiperfosforilación de NSP5 es estimulada por su interacción con NSP2 *in vivo*. Aparentemente NSP2 se une con la región N-terminal de NSP5, ya que la deleción de los 33 aa N-terminales de NSP5 promovió su hiperfosforilación *in vivo* y la convirtió en una proteína insensible a la activación por NSP2 (Afrikanova *et al.*, 1998). En consecuencia, se ha propuesto que el dominio N-terminal de NSP5 funciona como un dominio inhibitorio de la hiperfosforilación, por lo que el incremento en esta actividad podría ser inducido por cambios conformacionales resultantes de la interacción de NSP5 con NSP2. Estas observaciones están de acuerdo con la idea de que la multimerización de NSP5 es importante para la actividad de hiperfosforilación de la proteína, ya que se encontró que la interacción de la NSP5 completa (por medio del ensayo de los dos híbridos) es más eficiente con las mutantes de deleción N-terminales $\Delta N130$ y $\Delta N162$ que con la proteína NSP5 silvestre (Figura 2). Por lo tanto, el dominio N-terminal de alguna manera podría impedir la asociación óptima entre dos o más polipéptidos de NSP5 (que es promovida por el

dominio de multimerización) por lo que no se llevaría a cabo una transfosforilación eficiente. De los datos de este trabajo parece ser que la hiperfosforilación de NSP5 es aumentada por NSP2, más que ser estrictamente dependiente de esta proteína.

NSP6 es otra proteína que puede tener un papel regulatorio en la multimerización de NSP5, y por lo tanto, en su actividad de hiperfosforilación. Esta hipótesis se basa en la observación de que en NSP5 los dominios de multimerización y de interacción con NSP6 se yuxtaponen (Figura 13). El papel regulatorio de NSP6 lo sugiere también su baja expresión en células infectadas con rotavirus (Mattion *et al.*, 1991; Figura 1 del artículo anexo). Interesantemente, no se ha encontrado un ORF para NSP6 en el gene 11 de la cepa Mc323 y Alabama de los rotavirus del grupo A o en los genes homólogos de las cepas de los rotavirus del grupo C. Así, el papel regulatorio que se propone para NSP6, o cualquier otra función que pudiera tener, quizá sea una fina modulación que de algún modo sería sustituida. Es deseable determinar el efecto de NSP6 sobre la fosforilación de NSP5.

En un esquema general la hiperfosforilación de NSP5 se regula en diferentes etapas donde las asociaciones intermoleculares parecen ser fundamentales. La activación de la hiperfosforilación de esta proteína se dispara aparentemente por su multimerización. Adicionalmente, las asociaciones de NSP5 con NSP2 y NSP6 por medio de sus dominios N y C-terminales, respectivamente, pueden ser determinantes en el nivel de hiperfosforilación que NSP5 alcanza en las células infectadas con rotavirus.

Multimerización/hiperfosforilación de NSP5 y el ensamblaje de los viroplasmata.

Los resultados que muestran una correlación entre la capacidad de multimerización/hiperfosforilación de NSP5 y su habilidad para formar pseudo-viroplasmata (Figura 12), coloca a la multimerización de NSP5 en un papel central entre las actividades identificadas de esta proteína, y probablemente en la replicación de los rotavirus. Para probar esto, será necesario determinar si tanto la hiperfosforilación como la formación de los pseudo-viroplasmata dependen estrictamente de la multimerización de NSP5. Se ha reportado que la dimerización de serina/treonina cinasas puede ser alcanzada por compuestos inductores de la dimerización (CIDs); esto es por sí mismo suficiente para regular su actividad (Clemons, 1999; Farrar *et al.*, 1996; Luo *et al.*, 1996). La restauración de la multimerización en la mutante $\Delta C10$, p. ej. a través de la fusión en su extremo C-terminal de secuencias heterólogas con capacidad para autoasociarse (Iyer *et al.*, 1991; Katz *et al.*, 1998) o unirse a CIDs, puede ser una alternativa directa para identificar el potencial de la multimerización en las actividades de NSP5.

Tampoco es claro si la formación de pseudo-viroplasmata es dependiente de la multimerización, de la hiperfosforilación de NSP5 o de ambas. Resulta significativo que el 35% de los residuos de Ser y Thr de NSP5 están concentrados en los primeros 38 aminoácidos del extremo amino, que es el dominio propuesto de interacción con NSP2. La fosforilación de NSP5 en esta región pudiera ser importante para su asociación con NSP2, y por ende, para la generación de los viroplasmata en las células infectadas con rotavirus.

La eficiencia de formación de los pseudo-viroplasmata constituidos por NSP5 y NSP2 es baja, ya que no en todas las células que expresan transitoriamente las dos proteínas se pueden identificar estas estructuras. La asociación de NSP6 con NSP5 sugiere que NSP6 podría actuar como un catalizador en el ensamblaje de los pseudo-viroplasmata, posiblemente a través de la

regulación de la multimerización y/o de la fosforilación de NSP5. En nuestro laboratorio se está determinando el efecto de NSP6 sobre el ensamblaje de los pseudo-viroplasmias.

Participación de NSP5 en los eventos moleculares que anteceden la replicación del genoma de los rotavirus y la morfogénesis del virión.

Como un resumen de los datos presentados aquí, se propone el siguiente modelo de trabajo que toma en cuenta la información disponible actualmente:

La adición de unos pocos fosfatos sobre NSP5, para producir la isoforma de 26 kDa, ocurre posiblemente por medio de un evento autocatalítico intramolecular de tasa baja, aunque aún no se ha descartado un ataque específico por una cinasa celular. Esta fosforilación primaria podría hacer de NSP5 una proteína con mayor capacidad para autofosforilarse sobre múltiples residuos de serina/treonina, como se ha mostrado para otras proteínas kinasas (Johnson, 1993; Newton, 1997), lo que produciría la especie de 28 kDa. Con base en los resultados de la mutante $\Delta C10$, es este trabajo se propone que la multimerización de NSP5 (a través de su dominio carboxilo) es esencial para la activación de su hiperfosforilación (generación de las isoformas de 30-34 kDa). La fosforilación de NSP5 en su extremo amino, que aparentemente actúa como un péptido inhibitorio, podría crear un ambiente adecuado para su interacción con NSP2; esta proteína aparentemente induciría un cambio conformacional en NSP5 que la liberaría de su inhibición. La modificación de la estructura de NSP5 podría repercutir en un mejor acoplamiento de los polipéptidos en el homomultímeros de NSP5, lo que facilitaría su fosforilación en *trans*, por lo que habría un incremento en la hiperfosforilación de esta proteína. La interacción de NSP6 con el extremo C-

terminal de NSP5 podría influir sobre la multimerización de NSP5 y consecuentemente sobre su hiperfosforilación. Los fosfatos que estarían unidos a NSP5 a lo largo del ciclo de replicación de los rotavirus probablemente serían mantenidos en un equilibrio dinámico por la acción de cinasas y fosfatasas celulares. Una vez ensamblados, los complejos de las proteínas NSP5, NSP2 y NSP6 se podrían organizar para construir el andamio de los viroplasma. Las proteínas estructurales y no-estructurales, y los mRNAs virales se incorporarían al “esqueleto” de NSP2-NSP5-NSP6 del viroplasma. Durante este proceso las partículas subvirales conocidas como “precore” RI, que están integradas por RNA viral, las proteínas estructurales VP1 y VP3, y las proteínas no-estructurales NSP1 y NSP3, también ingresarían al viroplasma. Posteriormente NSP1 y NSP3 serían separadas del “precore” RI al incorporarse la proteína VP2, para dar origen a un complejo que llegará a ser la nucleocápside de los viriones, y con lo cual se podría activar la replicación de los mRNAs virales. Esta “protonucleocápside” de VP2, VP1, VP3 y RNA se asociaría temporalmente con los complejos de NSP5, NSP2 y NSP6, posiblemente a través de la interacción entre VP1 y NSP2 (y posiblemente NSP5), para formar el “core” RI. Esta partícula podría utilizar la actividad de ATPasa de NSP2 para facilitar la internalización de los RNAs, con lo cual se promovería una replicación eficiente. Los dsRNA sintetizados podrían inducir la restructuración de la “protonucleocápside”, que la liberarían de su asociación con el complejo NSP5-NSP2-NSP6, y entonces como una nucleocápside “madura” podría unirse a VP6, constituyéndose el “core” VP6. De este modo se habrían efectuado la replicación del genoma y la morfogénesis del virión de los rotavirus.

Aún no es claro si la función de NSP5 es solamente estructural, como un componente del andamio de los viroplasma, o si participa activamente en algún evento relacionado con la replicación de los rotavirus. Proteínas virales que son modificadas por fosforilación participan en funciones tan diversas tales como la activación de la transcripción y la replicación, así como el ensamblaje y el “budding” (Burnette *et al.*, 1993; Kann *et al.*, 1994; Yu *et al.*, 1994; Coates *et al.*, 1995; Herrmann *et al.*, 1995). Son necesarios experimentos adicionales para definir el papel de esta proteína, y ese de NSP6 y NSP2, en el ciclo de replicación de los rotavirus.

PERSPECTIVAS

Aún se desconocen los mecanismos moleculares de la mayoría de los eventos relacionados con la replicación del genoma de los rotavirus, como son la selección específica de los 11 RNAs de polaridad positiva y su empaquetamiento dentro de la nucleocápside, entre otros. En estos eventos podrían estar involucrada la proteína NSP5, de la cual no se sabe su función.

A partir de los resultados de este trabajo es posible diseñar estrategias para tratar de determinar el papel de NSP5 en la replicación de los rotavirus. Por ejemplo, la identificación del dominio de multimerización de NSP5 en su extremo C-terminal permitirá construir mutantes negativas dominantes, es decir, proteínas que conserven el dominio de multimerización de NSP5 pero tengan deletada otra región clave, por lo que al asociarse con una NSP5 nativa podrían interferir en su función. Para este propósito resulta significativo que el dominio de multimerización de NSP5 aislado (20 aa) aún pueda asociarse con una NSP5 completa *in vivo* (Figura 2 del artículo anexo). Existen varias regiones que son candidatas para llevar a cabo algunas de las actividades de NSP5: aa 1-32, región de interacción con NSP2; aa 34-80, sustrato de la hiperfosforilación; aa 131-179, dominio de cinasa. De este modo, es probable que utilizando un conjunto de mutantes negativas dominantes se pueda discriminar la participación de NSP5 y de cada uno de sus dominios en la replicación de los rotavirus.

Para determinar cómo la fosforilación de NSP5 afecta la replicación de los rotavirus una estrategia será emplear compuestos que disminuyan la adición de fosfatos sobre esta proteína *in vivo*. Un candidato es el inhibidor H7, que redujo significativamente la fosforilación de NSP5 *in vitro*. Como ya se mencionó, experimentos preliminares de nuestro laboratorio sugieren que H7 reduce la fosforilación de NSP5 *in vivo* aproximadamente cuatro veces y baja la producción de progenie viral de 10 a 100 veces (T. López *et al.*, datos no publicados).

Los resultados de este trabajo sugieren que NSP5 es una cinasa que se autofosforila y fosforila sustratos heterólogos. De aquí se desprenden algunas preguntas de interés que

deberán ser abordadas experimentalmente para abundar sobre el papel de esta proteína en la replicación de los rotavirus: NSP5 es realmente una proteína cinasa? NSP5 puede fosforilar proteínas celulares en células infectadas con rotavirus? NSP5 puede activar cascadas de señales intracelulares? Dos interrogantes más que surgieron a partir de este trabajo son: 1) la multimerización NSP5 es el activador de su hiperfosforilación y de su habilidad para ensamblarse en pseudo-viropasmas e interactuar con NSP6?; y 2) NSP6 participa como un regulador de NSP5?

REFERENCIAS

- Abramson, J.S., et al. (1999).** Possible association of intussusception with rotavirus vaccination. *Pediatrics* **104**, 575.
- Afrikanova, I., Miozzo, M. C., Giambiagi, S. & Burrone, O. R. (1996).** Phosphorylation generates different forms of rotavirus NSP5. *Journal of General Virology* **77**, 2059-2065.
- Afrikanova, I., Fabbretti, E., Miozzo, M. C. & Burrone, O. R. (1998).** Rotavirus NSP5 phosphorylation is up-regulated by interaction with NSP2. *Journal of General Virology* **79**, 2679-2686.
- Aponte, C., Poncet, D. & Cohen, J. (1996).** Recovery and characterization of a replicase complex in rotavirus-infected cells by using a monoclonal antibody against NSP2. *Journal of Virology* **70**, 985-991.
- Arias, C. F., Romero, P., Alvarez, V., Lopez, S. (1996).** Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity. *Journal of Virology* **70**: 5832-5839
- Au, K.-S., Chan, W. K., Burns, J. W. & Estes, M. K. (1989).** Receptor activity of rotavirus nonstructural glycoprotein NS28. *Virology* **63**, 4553-4562.
- Au, K.-S., Mattion, N. M. & 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. & Estes, M. K. (1996).** Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. *Science* **272**, 101-104.
- Blackhall, J., Fuentes, A., Hansen, K. & Magnusson, G. (1997).** Serine protein kinase activity associated with rotavirus phosphoprotein NSP5. *Journal of Virology* **71**, 138-144.
- Blackhall, J., Muñoz, M., Fuentes, A. & Magnusson, G. (1998).** Analysis of rotavirus nonstructural protein NSP5 phosphorylation. *Journal of Virology* **72**, 6398-6405.
- Bremont, M., Chabanne-Vautherot, D. & Cohen, J. (1993).** Sequence analysis of three non structural proteins of a porcine group C (Cowden strain) rotavirus. *Archives of Virology* **130**, 85-92.
- Bruns, R. F., Miller, F. D., Merriman, R. L., Howbert, J. J., Health, W. F., Kobayashi, E., Takahashi, I., Tamaoki, T. & Nakano, H. (1991).** Inhibition of protein kinase C by calphostin C is light-dependent. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **176**, 288-293.
- Burnette, B., Yu, G., Felsted R. L. (1993).** Phosphorylation of HIV-1 gag proteins by protein kinase C. *The Journal of Biological Chemistry* **268**, 8698-8703.
- Chan, W. K., Au, K. S. & Estes, M. K. (1988).** Topography of the simian rotavirus nonstructural glycoprotein (NS28) in the endoplasmic reticulum membrane. *Virology* **164**, 435-442.
- Chen, D., Gombold, J. L. & Ramig, R. F. (1990).** Intracellular RNA synthesis directed by temperature-sensitive mutants of simian rotavirus SA11. *Virology* **178**, 143-151.
- Chen, G. M., Hung, T. & Mackow, E. R. (1990).** cDNA cloning of each genomic segment of the group B rotavirus ADRV: molecular characterization of the 11th RNA segment. *Virology* **175**, 605-609.
- Chen, D., Zeng, C. Q.-Y., Wentz, M. J., Gorziglia, M., Estes, M. K. & Ramig, R. F. (1994).** Template-dependent, in vitro replication of rotavirus RNA. *Journal of Virology* **68**, 7030-7039.

Chen, D. & Patton, J. T. (1998). Rotavirus RNA replication requires a single-stranded 3' end for efficient minus-strand synthesis. *Journal of Virology* **72**, 7387-7396.

Chijiwa, T., Mishima, A., Hagiwara, M., Sano, M., Hayashi, K., Inoue, T., Naito, K., Toshioka, T. & Hidaka, H. (1990). Inhibition of forskolin-induced neurite outgrowth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89), of PC12D pheochromocytoma. *The Journal of Biological Chemistry* **265**, 5267-5272.

Clemons, P. A. (1999). Design and discovery of protein dimerizers. *Current Opinion in Chemical Biology* **3**, 112-115.

Coates K. & Harris M. (1995). The human immunodeficiency virus type 1 Nef protein functions as a protein kinase C substrate in vitro. *The Journal of General Virology* **76**, 837-844.

Cohen, J., Laporte, J., Charpilienne, A. & Scherrer, R. (1979). Activation of rotavirus RNA polymerase by calcium chelation. *Archives in Virology* **60**, 177-186.

Cohen, J., Charpilienne, A. Chilmonczyk, S. & Estes, M. K. (1989). Nucleotide sequence of bovine rotavirus gene 1 and expression of the gene product in baculovirus. *Virology* **171**, 131-140.

Cohen, P., Holmes, C. F. B. & Tsukitani, Y. (1990). Okadaic acid, a new probe for the study of cellular regulation. *Trends in Biochemical Sciences* **15**, 98-102.

Cozzone, A. J. (1993). ATP-dependent protein kinases in bacteria. *Journal of Cellular Biochemistry* **51**, 7-13.

Cuadras, M. A., Arias, C. F. & López, S. (1997). Rotaviruses induce an early membrane permeabilization of MA104 cells and do not require a low intracellular Ca²⁺ concentration to initiate their replication cycle. *Journal of Virology* **71**, 9065-9074.

Desselberger, U. & McCrae, M. A. (1994). The rotavirus genome. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **185** : 31-66.

Desselberger, U. (1998). Viral gastroenteritis. *Current Opinion in Infectious Diseases* **11**, 565-575.

Dobos, K. M., Khoo, K.-H., Swiderek, K. M., Brennan, P. J. & Belisle, J. T. (1996). Definition of the full extent of glycosylation of the 45-kilodalton glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Bacteriology* **178**, 2498-2506.

Ericson, B. L., Graham, D. Y., Mason, B. B., Hanssen, H. H. & Estes, M. K. (1983). Two types of glycoprotein precursors are produced by the simian rotavirus SA11. *Virology* **127**, 320-332.

Estes, M. K. & Cohen, J. (1989). Rotavirus gene structure and function. *Microbiology Review* **53**, 410-449.

Estes, M. K. (1996). Rotavirus and their replication. In *Fields virology*, 3th edn, pp. 1625-1655. Edited by B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, et al. Philadelphia: Lippincott - Raven Publishers.

Fabbretti, E., Afrikanova, I., Vascotto, F. & Burrone, O. R. (1999). Two non-structural rotavirus proteins, NSP2 and NSP5, form viroplasm-like structures *in vivo*. *Journal of General Virology* **80**, 333-339.

Farrar, M. A., Alberola-Ila, J. & Perlmutter, R. M. (1996). Activation of the raf-1 kinase cascade by coumermycin-induced dimerization. *Nature* **383**, 178-181.

- Fields, B. N. (1996).** Reoviridae. In *Virology*, pp. 1553-1555. Edited by B. N. Fields, D. N. Knipe, P. M. Howley, R. M. Chanock, J. L. Melnick, T. P. Monath, B. Roizman & S. E. Straus. New York: Raven Press.
- Frishman, D. & Argos, P. (1996).** Incorporation of non-local interactions in protein secondary structure prediction from the amino acid sequence. *Protein Engineering* **9**, 133-142.
- Fritz-Wolf, K., Schnyder, T., Wallimann, T., & Wolfgang, K. (1996).** Structure of mitochondrial creatine kinase. *Nature* **381**, 341-345.
- Fuerst, R. T., Niles, G. E., Studier, W. F. & Moss, B. (1986).** Eucaryotic transient-expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesized bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **83**, 8122-8126.
- Gallegos, C. O. & Patton, J. T. (1989).** Characterization of rotavirus replication intermediates: a model for the assembly of single-shelled particles. *Virology* **172**, 616-627.
- Gay, N., Ramsay, M. & Waight, P. (1999).** Rotavirus vaccination and intussusception. *The Lancet* **354**, 956.
- González, S. A. & 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. & Arias, C. F. (1998).** *In vivo* interactions among rotavirus nonstructural proteins. *Archives of Virology* **143**, 981-996.
- González, R. A., Espinosa, R., Romero, P., López, S. & Arias, C. F. (2000).** Relative localization of rotavirus structural and non-structural proteins in infected cells. Enviado a *Archives of Virology*.
- Guerrero, C. A., Méndez, E., Zárate, S., Isa, P., López, S. & Arias, C. F. (2000a).** The hsc70 protein is involved in rotavirus cell entry. Manuscrito en preparación.
- Guerrero, C. A., Zárate, S., Corkidi, G., López, S. & Arias, C. F. (2000b).** Biochemical characterization of rotavirus receptor in MA104 cells. Enviado a *Journal of Virology*.
- Guerrero, C. A., Zárate, S., Isa, P., Méndez, E., López, S. & Arias, C. F. (2000c).** Integrin $\alpha V\beta 3$ is a coreceptor for rotavirus infection. Enviado a *Journal of Virology*.
- Hanks, S. K. & Hunter, T. (1995).** The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB Journal* **9**, 576-596.
- Hannun, Y. A., Loomis, C. R., Merrill, Jr. A. H. & Bell, R. M. (1986).** Sphingosine inhibition of protein kinase C activity and of phorbol dibutyrate binding *in vitro* and in human platelets. *The Journal of Biological Chemistry* **261**, 12604-12609.
- Hart, G. W. (1997).** Dynamic o-linked glycosylation of nuclear and cytoskeletal proteins. *Annual Reviews in Biochemistry* **66**, 315-335.
- Heldin, C.-H. (1995)** Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* **80**, 213-223.
- Herrmann, C. H. & Rice, A. P. (1995).** Lentivirus tat proteins specifically associate with a cellular protein kinase, TAK, that hyperphosphorylates the carboxyl-terminal domain of the large subunit of RNA polymerase II: candidate for a tat cofactor. *Journal of Virology* **69**, 1612-1620.

- Hidaka, H., Inagaki, M., Kawamoto, S. & Sasaki Y. (1984).** Isoquinolinesulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotide dependent protein kinase and protein kinase C. *Biochemistry* **23**, 5036-5041.
- Hua, J., Chen, X. & Patton, J. T. (1994).** Deletion mapping of the rotavirus metalloprotein NS53 (NSP1): the conserved cysteine-rich region is essential for virus-specific RNA binding. *Journal of Virology* **68**, 3990-4000.
- Hua, J. & Patton, J. T. (1994).** The carboxyl-half of the rotavirus nonstructural protein NS53 (NSP1) is not required for virus replication. *Virology* **198**, 567-576.
- Huismans, H., van Dijk A. A. & Bauskin A. R. (1987).** *In vitro* phosphorylation and purification of a nonstructural protein of bluetongue virus with affinity for single-stranded RNA. *Journal of Virology* **61**, 3589-3595.
- Hunter, T. (2000).** Signaling -2000 and beyond. *Cell* **100**, 113-127.
- Iyer, S. V., Davis, D. L., Seal, S. N. & Burch, J. B. E. (1991).** Chicken vitellogenin gene binding protein, a leucine zipper transcription factor that binds to an important control element in the chicken vitellogenin II promoter, is related to rat DBP. *Molecular and Cellular Biology* **11**, 4863-4875
- Jacobson, A. (1996).** Poly(A) metabolism and translation: the closed-loop model. In Translation Control, pp. 451-480. Edited by Hershey, J.W.B., Mathews, M. B. & Sonenberg, N. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Jacobson, R. M. (1999).** The current status of the rotavirus vaccine. *Vaccine* **17**, 1690-1699.
- Jiang, B., Tsunemitsu, H., Gentsch, J. R., Saif, L. J. & Glass, R. I. (1993).** Nucleotide sequence of genes 6 and 10 of a bovine group C rotavirus. *Nucleic Acids Research* **21**, 2250.
- Jiang, G & Hunter, T. (1999).** Receptor signaling: when dimerization is not enough. *Current Biology* **9**, R568-R571.
- Johnson, L. N. (1993).** The effects of phosphorylation on the structure and function of proteins. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **22**, 199-232.
- Kabcenell, A. K. & Atkinson, P. H. (1985).** Processing of the rough endoplasmic reticulum membrane glycoproteins of rotavirus SA11. *Journal of Cellular Biology* **101**, 1270-1280.
- Kann, M. & Gerlich, W. H. (1994).** Effect of core protein phosphorylation by protein kinase C on encapsidation of RNA within core particles of hepatitis B virus. *Journal of Virology* **68**, 7993-8000.
- Kapikian, A. Z. & Chanock, R. M. (1996).** Rotaviruses. In *Fields Virology*, pp. 1657-1708. Edited by B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley. New York: Raven Press.
- Karaszkiwicz, J. W. & Henrich, C. J. (1997).** Using protein kinase and protein phosphatase inhibitors to dissect protein phosphorylation pathways. In *Current Protocols in Immunology*, pp. 11.7.1-11.7.20. Edited by . City: John Wiley & Sons, Inc.
- Kattoura, M. D., Clapp, L. L. & Patton, J. T. (1992).** The rotavirus nonstructural protein, NS35, possesses RNA-binding activity *in vitro* and *in vivo*. *Virology* **191** , 698-708.
- Kattoura, M. D., Chen, X. & Patton, J. T. (1994).** The rotavirus RNA-binding protein NS35 (NSP2) forms 10S multimers and interacts with the viral RNA polymerase. *Virology* **202**, 803-813.

- Katz, B.-Z., Krylov, D., Aota, S.-i., Olive, M., Vinson, C. & Yamada, K. M. (1998).** Green Fluorescent protein labeling of cytoskeletal structures-novel targeting approach based on leucine zippers. *Biotechniques* **25**, 298-302.
- Kawamoto, S. & Hidaka, H. (1994).** 1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine (H-7) is a selective inhibitor of protein kinase C in rabbit platelets. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **125**, 258-264.
- Kenyon, G. L. & Reed, G. H. (1986).** Creatinine kinase: structure-activity relationships. *Advan. Enzymol.* **54**, 367-426.
- Klemm, J. D., Schreiber, S. L. & Crabtree, G. R. (1998).** Dimerization as a regulatory mechanism in signal transduction. *Annual Review of Immunology* **16**, 569-592.
- Kobayashi, E., Nakano, H., Morimoto, M. & Tamaoki, T. (1989).** Calphostin C (UCN-1028C), a novel microbial compound, is a highly potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **159**, 548-553.
- Labbe, M., Baudoux, P., Charpilienne, A., Poncet, D. & Cohen, J. (1994).** Identification of the nucleic acid binding domain of the rotavirus VP2 protein. *Journal of General Virology* **75**, 3423-3430.
- Lawton, J. A., Estes, M. K. & Prasad, B. V. V. (1997).** Three dimensional visualization of mRNA release from actively transcribing rotavirus particles. *Nature Structural Biology* **4**, 118-121.
- Lawton, J. A., Estes, M. K. & Prasad, B. V. V. (1999).** Comparative structural analysis of transcriptionally competent and incompetent rotavirus-antibody complexes. *Proceedings of the National Academy of the Sciences USA* **96**, 5428-5433.
- Legrain, P., Dokhelar, M.-C. & Transy C. (1994).** Detection of protein-protein interactions using different vectors in the two-hybrid system. *Nucleic Acids Research* **22**, 3241-3242.
- Leonard, C. J., Aravind, L. & Koonin, E. V. (1998).** Novel families of putative protein kinases in bacteria and archae: evolution of the "eucariotic" protein kinase superfamily. *Genome Research* **8**, 1038-1047.
- Liu, M., Mattion, N. M. & Estes, M. K. (1992).** Rotavirus VP3 expressed in insect cells possesses guanylyltransferase activity. *Virology* **188**, 77-84.
- López, S. & Arias, C. F. (1993).** Protein NS26 is highly conserved among porcine rotavirus strains. *Nucleic Acids Research* **21**, 1042.
- Lubas, W. A., Smith, M., Starr, C. M. & Hanover, J. A. (1995).** Analysis of nuclear pore protein p62 glycosylation. *Biochemistry* **34**, 1686-1694.
- Ludert, J. E., Michelangeli, F., Gil, F., Liprandi, F. & Esparza, J. (1987).** Penetration and uncoating of rotaviruses in cultured cells. *Intervirology* **27**, 95-101.
- Lundgren, O., Peregrin, A. T., Persson, K., Kordasti, S., Uhnoo, I. & Svensson, L. (2000).** Role of the enteric nervous system in the fluid and electrolyte secretion of rotavirus diarrhea. *Science* **287**, 491-495.
- Luo, Z., Tzivion, G., Belshaw, P. J., Vavvas, D., Marshall, M. & Avruch, J. (1996).** Oligomerization activates c-Raf-1 through a Ras dependent mechanism. *Nature* **383**, 181-185.

- Mattion, N. M., Mitchell, D. B., Both, G. W. & Estes, M. K. (1991)** Expression of rotavirus proteins encoded by alternative open reading frames of genome segment 11. *Virology* **181**, 295-304.
- Mattion, N. M., Cohen, J., Aponte, C. & Estes, M. (1992).** Characterization of an oligomerization domain and RNA-binding properties on rotavirus nonstructural protein NS34. *Virology* **190**, 68-83.
- Mattion, N. M., Cohen, J. & Estes, M. K. (1994).** The rotavirus proteins. In *Viral Infections of the Gastrointestinal Tract*, pp. 169-249. Edited by A. Kapikian. New York: Marcel Dekker.
- Méndez, E., Arias, C.F., Lopez, S. (1996).** Interactions between the two surface proteins of rotavirus may alter the receptor-binding specificity of the virus. *Journal of Virology* **70**, 1218-1222.
- Merrill, Jr. A. H., Nimkar S., Menaldino, D., Hannun, Y. A., Loomis, C., Bell, R. M., Tyagi, S. R., Lambeth, D., Stevens, V. L., Hunter, R. & Liotta, D. C. (1989).** Structural requirements for long chain (sphingoid) base inhibition of protein kinase C *in vitro* and for the cellular effects of these compounds. *Biochemistry* **28**, 3138-3145.
- Newton, A. (1997)** Regulation of protein kinase C. *Current Opinion in Cell Biology* **9**, 161-167.
- Patton, J. T. & Gallegos, C. O. (1988).** Structure and protein composition of the rotavirus replicase particle. *Virology* **166**, 358-365.
- Patton, J. T. & Gallegos, C. O. (1990).** Rotavirus RNA replication: single-stranded RNA extends from the replicase particle. *Journal of General Virology* **71**, 1087-1094.
- Patton, J. T. (1995).** Structure and function of the rotavirus RNA-binding proteins. *Journal of General Virology* **76**, 2633-2644.
- Patton, J. T. (1996).** Rotavirus VP1 alone specifically binds to the 3' end of viral mRNA, but the interaction is not sufficient to initiate minus-strand synthesis. *Journal of Virology* **70**, 7940-7947.
- Patton, J. T., Jones, M. T., Kalbach, A. N., He, Y.-W. & Xiaobo, J. (1997).** Rotavirus RNA polymerase requires the core shell protein to synthesize de double-stranded RNA genome. *Journal of Virology* **71**, 9618-9626.
- Patton, J. T. & Chen, D. (1999).** RNA-binding and capping activities of proteins in rotavirus open cores. *Journal of Virology* **73**, 1382-1391.
- Petric, M., Mayur, K., Vonderfecht, S. & Eiden, J. J. (1991).** Comparison of group B rotavirus genes 9 and 11. *Journal of General Virology* **72**, 2801-2804.
- Piron, M., Vende, P., Cohen, J. & Poncet, D. (1998).** Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4GI and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F. *The EMBO Journal* **17**, 5811-5821.
- Piron, M., Delaunay, T., Grosclaude, J. & Poncet, D. (1999).** Identification of the RNA-binding, dimerization, and eIF4GI-binding domains of rotavirus nonstructural protein NSP3. *Journal of Virology* **73**, 5411-5421.
- Plummer, Jr. T. H., Tarentino, A. L. & Hauer, C. R. (1995).** Novel, specific o-glycosylation of secreted *Flavobacterium meningosepticum* proteins. *The Journal of Biological Chemistry* **270**, 13192-13196.

- Poncet, D., Aponte, C. & Cohen, J. (1993).** Rotavirus protein NSP3 (NS34) is bound to the 3' end consensus sequence of viral mRNAs in infected cells. *Journal of Virology* **67**, 3159-3165.
- Poncet, D., Laurent, S. & Cohen, J. (1994).** Four nucleotides are the minimal requirement for RNA recognition by rotavirus non-structural protein NSP3. *The EMBO Journal* **13**, 4165-4173.
- Poncet, D., Lindenbaum, P., L'Haridon, R. & Cohen, J. (1997).** *In vivo* and *in vitro* phosphorylation of rotavirus NSP5 correlates with its localization in viroplasm. *Journal of Virology* **71**, 34-41.
- Prasad, B. V. V. & Chiu, W. (1994).** Structure of rotavirus. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **185**, 9-29.
- Prasad, B. V. V., Rothnagel, R., Zeng, C. Q.-Y., Jakana, J., Lawton, J. A., Chiu, W. & Estes, M. K. (1996).** Visualization of ordered genomic RNA and localization of transcriptional complexes in rotavirus. *Nature* **382**, 471-473.
- Prasad, B. V. V. & Estes, M. K. (1997).** Molecular basis of rotavirus replication. Structure-function correlations. In *Structural biology of viruses*, pp. 239-268. Edited by W. Chiu, R. M. Burnett & R. L. Garcea. New York: Oxford University Press.
- Ramig, R. F. & Petrie, B. L. (1984).** Characterization of temperature sensitive mutants of simian rotavirus SA11: protein synthesis and morphogenesis. *Journal of Virology* **49**, 665-673.
- Roe, J. L., Durfee, T., Zupan, J. R., Repetti, P. P., McLean B. G. & Zambryski, P. C. (1997).** TOUSLED is a nuclear serine/threonine protein kinase that requires a coiled-coil region for oligomerization and catalytic activity. *The Journal of Biological Chemistry* **272**, 5838-5845.
- Rossi, F., Labourier, E., Forné, T., Divita, G., Derancourt, J., Riou, J. F., Antoine, E., Cathala, G., Brunel, C. & Tazi, J. (1996).** Specific phosphorylation of SR proteins by mammalian DNA topoisomerase I. *Nature* **381**, 80-82.
- Rüegg, U. T. & Burgess, G. M. (1989).** Staurosporine, K-252 and UCN-01: potent but nonspecific inhibitors of protein kinases. *Trends in Pharmacological Sciences* **10**, 218-220.
- Sandino, A. M., Jashes, M., Faundez, G. & Spencer, E. (1986).** Role of the inner protein capsid on *in vitro* human rotavirus transcription. *Journal of Virology* **60**, 797-802.
- Schächtele, C., Seifert, R. & Osswald H. (1988).** Stimulus-dependent inhibition of platelet aggregation by the protein kinase C inhibitors polymyxin B, H-7 and staurosporine. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **151**, 542-547.
- Suzuki, T. & Furukohri, T. (1994).** Evolution of phosphagen kinase. Primary structure of glycoamine kinase and arginine kinase from invertebrates. *Journal of Molecular Biology* **237**, 353-357.
- Suzuki, T., Kawasaki, Y., Unemi, Y., Nishimura, Y., Soga, T., Kamidochi, M., Yazawa, Y. & Furukohri, T. (1998).** Gene duplication and fusion have occurred frequently in the evolution of phosphagen kinases - a two-domain arginine kinase from the clam *Pseudocardium sachalinensis*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1388**, 253-259.
- Suzuki, N., Hosokawa, D., Matsuura, Y., Kikuchi, A. & Omura T. (1999a).** *In vivo* and *in vitro* phosphorylation of rice dwarf phyto-reovirus Pns12 cytoplasmic nonstructural protein. *Archives of Virology* **144**, 1371-1380.

- Suzuki, H., Katsushima, N. & Konno, T. (1999b).** Rotavirus vaccine put on hold. *The Lancet* **354**, 1390.
- Svensson, L., Finlay, B. B., Bass, D., von Bonsdorff, C.H. & Greenberg, H. B. (1991).** Symmetric infection of rotavirus on polarized human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Journal of Virology* **65**: 4190-4197.
- Tamaoki, T., Nomoto, H., Takahashi, I., Kato, Y., Morimoto, M. & Tomita, F. (1986).** Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca⁺⁺ dependent protein kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **135**, 397-402.
- Taraporewala, Z., Chen, D. & Patton, J. T. (1999).** Multimers formed by the rotavirus nonstructural protein NSP2 bind to RNA and have nucleoside triphosphatase activity. *Journal of Virology* **73**, 9934-9943.
- Taylor, S. S., Knighton, D. R., Zheng, J., Eyck, L. F. T. & Sowadski, J. M. (1992).** Structural framework for the protein kinase family. *Annual Reviews in Cellular Biology* **8**, 429-462.
- Theron, J., Uitenweerde, J. M., Huismans, H. & Nel, L. H. (1994).** Comparison of the expression and phosphorylation of the non-structural protein NS2 of three different orbiviruses: evidence for the involvement of an ubiquitous cellular kinase. *Journal of General Virology* **75**, 3401-3411.
- Thomas, C. P., Booth, T. F. & Roy, P. (1990).** Synthesis of bluetongue virus-encoded phosphoprotein and formation of inclusion bodies by recombinant baculovirus in insect cells: it binds the single-stranded RNA species. *Journal of General Virology* **71**, 2073-2083.
- Tirode, F., Malaguti, C., Romero, F., Attar, R., Camonis, J. & Egly, J. M. (1997).** A conditionally expressed third partner stabilizes or prevents the formation of a transcriptional activator in a three-hybrid system. *The Journal of Biological Chemistry* **272**, 22995-22999.
- Valenzuela, S., Pizarro, J., Sandino, A. M., Vasquez, M., Fernández, J., Hernández, O., Patton, J. & Spencer, E. (1991).** Photoaffinity labeling of rotavirus VP1 with 8-azido-ATP: identification of the viral RNA polymerase. *Journal of Virology* **65**, 3964-3967.
- Welch, S. W., Crawford, S. E. & Estes, M. K. (1989).** Rotavirus SA11 genome segment 11 protein is a nonstructural phosphoprotein. *Journal of Virology* **63**, 3974-3982.
- Wentz, M. J., Patton, J. T. & Ramig, R. F. (1996).** The 3'-terminal consensus sequence of rotavirus RNA is the minimal promoter of negative-strand RNA synthesis. *Journal of Virology* **70**, 7833-7841.
- Wu, J. Y., Zhou, Z. Y., Judd, A., Cartwright, C. A. & Robinson, W. S. (1990).** The hepatitis B virus-encoded transcriptional transactivator hbx appears to be a novel protein serine/treonine kinase. *Cell* **63**, 687-695.
- Xu, A., Bellamy, B. & Taylor, J. A. (1998).** Bip (GRP78) and endoplasmic reticulum (GRP94) are induced following rotavirus and bind transiently to an endoplasmic reticulum-localized virion component. *Journal of Virology* **72**, 9865-9872.
- Yu, M. & Summers, J. (1994).** Multiple functions of capsid protein phosphorylation in duck hepatitis B virus replication. *Journal of Virology* **68**, 4341-4348.
- Zárate, S., Espinosa, R., Romero, P., Méndez, E., Arias, C. F. & López, S. (2000).** The VP5 domain of VP4 can mediate attachment of rotaviruses to cells. *Journal of Virology* **74**, 593-599.