

00551
26



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

297881

DOMINIOS ESTRUCTURALES DE LA PROTEINA VP6
DE ROTAVIRUS POTENCIALMENTE RELEVANTES
PARA LA ACTIVIDAD DE TRANSCRIPCIÓN VIRAL

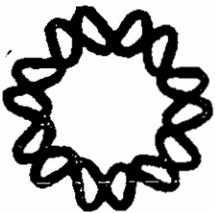
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A :

JIMENA PEREZ-VARGAS OBREGÓN



CUERNAVACA, MORELOS

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

El presente trabajo fué realizado en el departamento de Genética y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Carlos F. Arias Ortiz. Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca 128410.

La luna se puede tomar a cucharadas
o como una cápsula cada dos horas.

Es buena como hipnótico y sedante
y también alivia
a los que se han intoxicado de filosofía.

Pon una hoja tierna de la luna
debajo de tu almohada
y mirarás lo que quieras ver.

Lleva siempre un frasquito del aire de la luna
para cuando te ahogues,

y dale la llave de la luna
a los presos y a los desencantados.

Para los condenados a muerte
y para los condenados a vida

No hay mejor estimulante que la luna
en dosis precisas y controladas.

Jaime Sabines

A mi Mamá por lo que siempre ha sido.

A mi Papá por una voz constante.

A Mariana por el cariño, una gran mujer y porque sus exitos son el orgullo.

Al NE por no perder la altura.

A Alex, sin duda un hermano.

A los Obregón-Canessi, por lo que toca.

A Luis por los sueños alcanzados.

A Selene, Claudia y Vicky grandes amigas y grandes mujeres, simepre un ejemplo.

A los Guayabos: Gabriel, Ricardo, Pavel, Viviana, Mariana, Liliana, Martha, Lutz, Elia, Gus, Alejandro, Juan, Mauricio, Pedricola...por hacer del tiempo una sonriza.

A los que son y serán Arias/López: Pedro, Rafa, Fer, Carlos Arturo, Tomas, Karla, Marisol, Angélica, Tere, Dector, Minerva, Mariela, Ramón, Ma. Elena, Ernesto, Paz, Gina, Diana, Pedrito y los que me faltan...

Agradecimientos

A Carlos por segurime enseñando y por mostrarme que la ciencia y los virus son un mundo que no dejan de maravillarme.

A Susana por las charlas y las enseñanzas.

A los mimebros del jurado y del comite tutorial, por sus comentarios para este trabajo:

Dr. Carlos Arias O.

Dr. Lourdes Gutiérrez X.

Dr. Jean Louis Charli

Dr. Celso Ramos G.

Dr. Lorenzo Segovia F.

Dr. Sandino Estrada M.

A la Universidad Nacional Autónoma de México

INDICE

| | |
|----------------------|----|
| Resumen | 1 |
| Introducción | 2 |
| Objetivos | 16 |
| Materiales y Métodos | 17 |
| Resultados | 30 |
| Discusión | 43 |
| Conclusiones | 48 |
| Bibliografía | 49 |

RESUMEN

Los rotavirus están formados por tres capas concéntricas de proteínas que envuelven al genoma viral y a la polimerasa VP1. La capa más interna está formada por VP6. Las partículas de doble capa (DLPs) son capaces de sintetizar mensajeros virales tanto *in vivo* como *in vitro*. Cuando a estas partículas se les quita la proteína VP6 pierden la actividad y al añadirla se restablece la transcripción. El papel de VP6 es estructural, ya que la actividad de polimerasa está dada por VP1. La capa de VP6 forma canales que conectan el interior de la partícula con el exterior. Se ha demostrado que el mRNA viral se transloca hacia el exterior por estos canales, y se ha propuesto que el asa $\beta 1$ - $\beta 2$ de VP6, que se proyecta hacia el interior de los canales pudiera ser importante para la transcripción. Para analizar el papel de esta asa en la transcripción viral, construimos baculovirus recombinantes que expresan la proteína silvestre VP6 de los grupos de rotavirus A y C, así como una mutante con delección en el asa $\beta 1$ - $\beta 2$ y una mutante de VP6 que no trimeriza. Las proteínas producidas en este sistema se purificaron y se evaluó su capacidad para ensamblarse sobre partículas de una sola capa y para restablecer la actividad de transcripción. Los resultados indican que el asa $\beta 1$ - $\beta 2$ de VP6 que se proyecta hacia el interior de los canales no está involucrada en la transcripción, y para que haya transcripción es necesaria la trimerización de la proteína, para que se ensamble sobre los cores virales. Por último, confirmamos que la transcripción es específica de grupo, ya que la VP6 de grupo C forma DLPs morfológicamente iguales a las silvestres, pero estas son inactivas para la transcripción.

INTRODUCCION

Los rotavirus son reconocidos como el principal agente etiológico de gastroenteritis no bacteriana en niños menores de 3 años, causando diarrea severa y en casos extremos la muerte. También afecta a cachorros de diversas especies animales, de relevancia económica para el hombre [4].

Los rotavirus están clasificados dentro de la familia *Reoviridae*. La partícula viral madura está constituida por tres capas concéntricas de proteínas que envuelven un genoma de once segmentos de RNA de doble cadena. El genoma codifica para seis proteínas estructurales y seis no estructurales (Fig. 1)[3,10].

La capa externa está formada por dos proteínas: la glicoproteína VP7 que forma la superficie lisa de la partícula viral y la proteína VP4, que son 60 dímeros estructurados en forma de espículas que se proyectan de la superficie del virus. La proteína VP6 es la más abundante en el virión, se encuentra formando trímeros y constituye la capa intermedia. El core viral está formado por la capa más interna de proteínas, constituida por VP2, que en su cara interna interacciona con las proteínas VP1 y VP3, las cuales se han identificado como la RNA polimerasa y guanililtransferasa del virus, respectivamente. Además de esta interacción, VP2 se encuentra rodeando el genoma del virus, el cual tiene una estructura dodecaédrica [10].

Las otras seis proteínas (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 y NSP6) que no forman parte de la partícula madura se les conoce como proteínas no

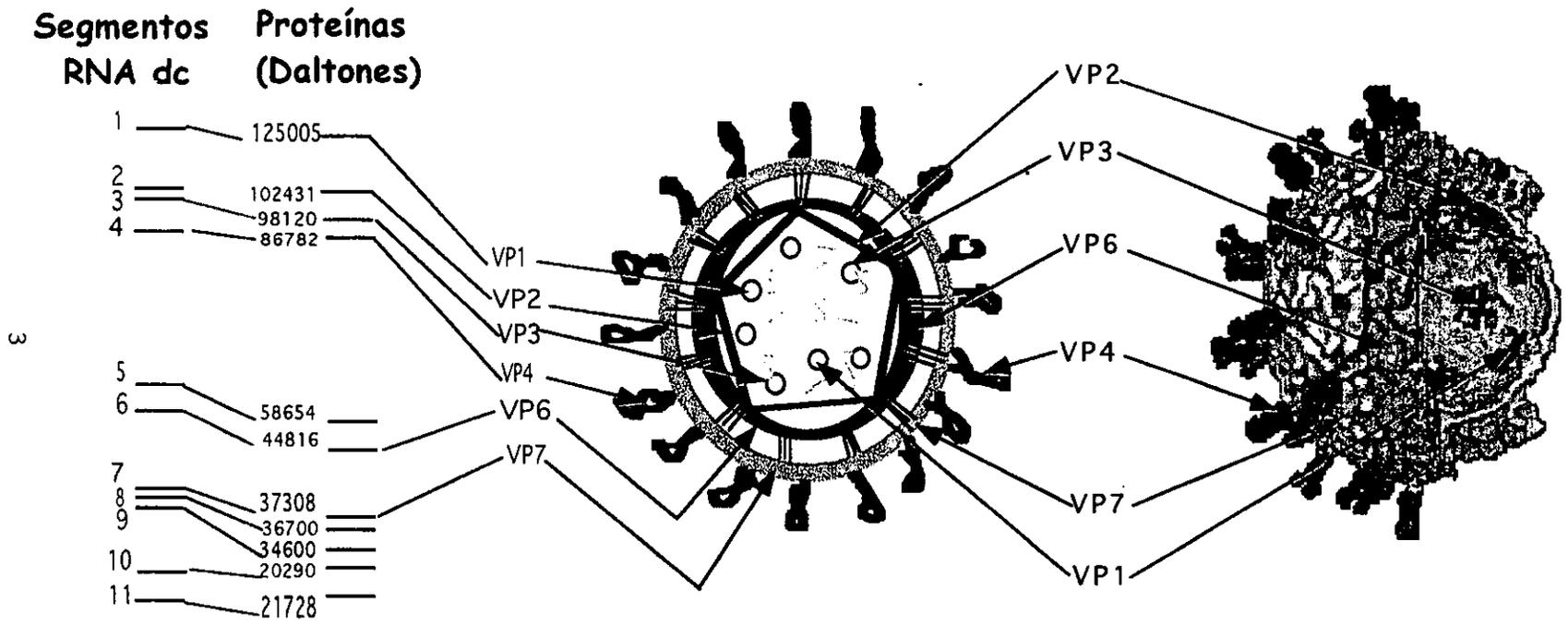


Fig. 1. Representación esquemática de rotavirus. Se muestra en el extremo izquierdo un patrón electroforético de los once segmentos de RNA dc del genoma viral y las proteínas para las que codifican. En el centro se muestra la localización de las proteínas en la estructura del virión. En el extremo derecho está la figura tridimensional del virión determinada por criomicroscopía electrónica.

estructurales porque participan en los procesos de replicación del genoma viral, así como en el ensamblaje del virión.

Estructura de la partícula

Estudios de criomicroscopía electrónica obtenidos a una resolución de 22 Å, han permitido modelar la estructura tridimensional de la partícula viral, la cual tiene una geometría icosaédrica con una simetría de T=13 (*levo*) (Fig. 2)[23, 31].

En la estructura del virus participan todos los elementos que la conforman, empezando por el genoma de RNA de doble cadena que se encuentra estructurado en forma dodecaédrica, alrededor de los complejos enzimáticos de VP1-VP3, de los cuales hay 12. Tanto el genoma, como las proteínas VP1 y VP3, interaccionan con la cara interna de la capa protéica formada por VP2, la cual se estructura por dímeros asimétricos, quasiequivalentes de esta proteína, con una geometría icosaédrica con simetría T=1 [23, 31].

Las interacciones de VP2 con VP6 no son equivalentes, ya que hay 120 moléculas de VP2 y 260 unidades triméricas de VP6. Las interacciones de VP6 con VP7, que forma la superficie lisa de la capa externa, son uno a uno, ya que VP7 también se encuentra formando 260 unidades triméricas, por lo cual en la partícula madura las dos capas más externas tienen una geometría T=13 (*levo*) (Fig.2).

La partícula tiene un sistema de 132 canales que atraviesan las tres capas de proteínas y conectan el interior de la partícula con el exterior. Hay 12 canales tipo I que están en los ejes de simetría de 5, que son circulares y tienen un diámetro aproximado de 40 Å; 60 canales tipo II que se encuentran

adyacentes a los vértices en los ejes de simetría de 2, rodeando los canales tipo I; y 60 canales tipo III que están en los ejes de simetría 3. Estos dos tipos de canales son más grandes, con un diámetro aproximado de 65 Å (Fig. 5). La función de los canales no se conoce aún, pero es posible que participen en la importación de metabolitos para la transcripción viral y para la salida de los transcritos de RNA viral al citoplasma de la célula [22, 23, 24]

VP4 está anclada en los canales tipo II, interaccionando en el interior con la proteína VP6 y en el exterior con VP7 que forma la superficie lisa de la partícula (Ver criomicroscopía electrónica de la figura 1)[30].

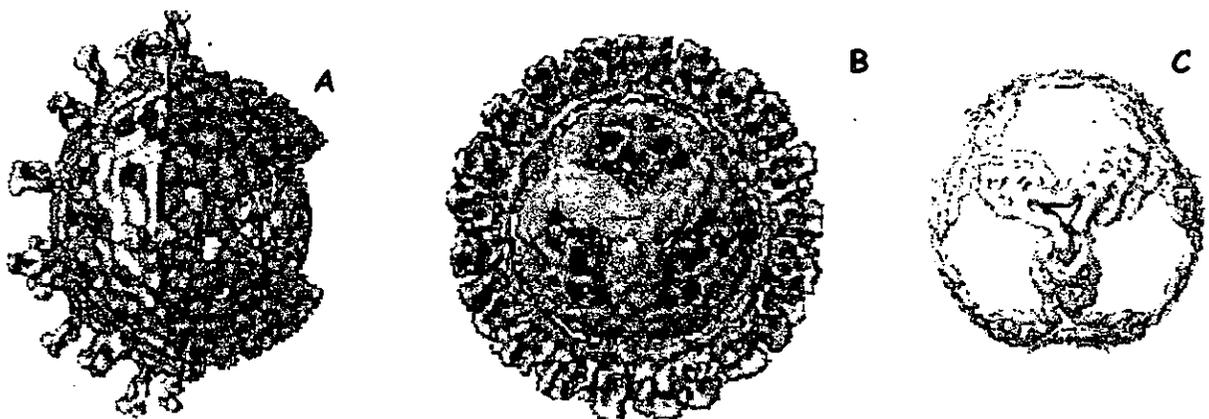


Fig. 2. Criomicroscopía de la partícula de rotavirus. En A un corte de una partícula de tres capas, en donde se pueden ver los canales que atraviesan las tres capas de proteínas. En B un corte de una partícula de doble capa en donde se ve la estructura del core y en C el RNA de doble cadena estructurado, tal y como se encuentra en la partícula. [23].

Tipos de partículas

Se pueden obtener tres tipos de partículas de rotavirus con propiedades biológicas y biofísicas distintas. Las partículas completas que tienen las tres capas de proteínas (TLPs, *Triple-Layered Particles*), son infecciosas y corresponden a la partícula madura, que es la única con capacidad de reconocer el receptor en la membrana de la célula e infectar a la célula huésped. Como la conformación de la capa externa depende de la presencia de iones calcio, agentes quelantes de este ion (por ejemplo: EGTA o EDTA) desestabilizan a la capa formada por VP7, lo cual provoca que se desensamble la capa externa de proteínas, incluyendo a VP4. Al perderse estas proteínas se pierde la capacidad de infectar a la células, generándose partículas de doble capa (DLPs, *Double-Layered Particles*) con apariencia rugosa. Estas partículas no son capaces de ingresar a la célula, pero si pueden iniciar el ciclo de replicación viral, si se introducen al citoplasma celular por transfección. Las DLPs tienen actividad transcripcional, que se pierde cuando se quita VP6, la proteína que forma la capa intermedia [6, 10].

Finalmente, los cores virales se pueden obtener por remoción de la capa de VP6, mediante el uso de agentes caotrópicos, como tiocianato de sodio o altas concentraciones de cloruro de calcio. Los cores no son infecciosos y son inactivos en la transcripción (Fig. 3) [7, 33].

TLP's (Triple capa)
VP7, VP4, VP6, VP2, VP1 y VP3
Infecciosa
Inactiva en transcripción

DLP's (Doble capa)
VP6, VP2, VP1 y VP3
No infecciosa
Activa en transcripción

Cores (Capa única)
VP2, VP1 y VP3
No infecciosa
Inactiva en transcripción

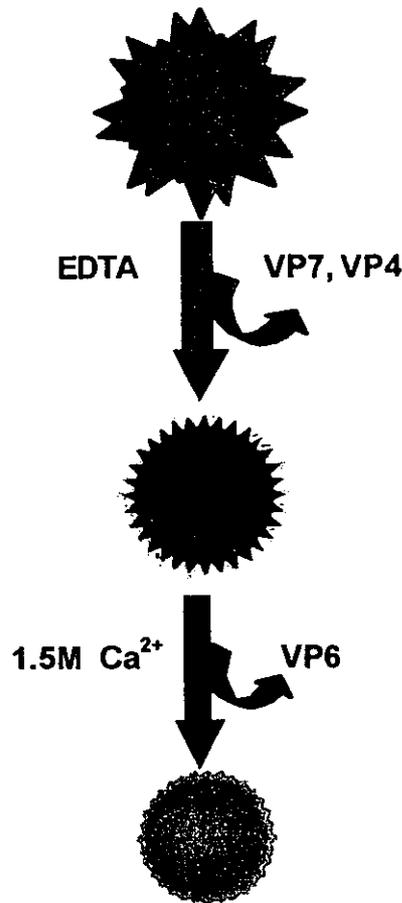


Fig. 3. Esquema de los tres tipos de partículas, las proteínas que las forman y sus propiedades.

VP6

En la partícula viral la proteína VP6 se asocia como trímeros, los cuales forman la capa intermedia del virus y es la proteína más abundante, constituyendo el 51% del virión [8]. Es una proteína de 397 aminoácidos (aa) (~41 kDa) formada por dos dominios de aproximadamente igual número de aminoácidos cada uno. El dominio inferior, formado por dos regiones discontinuas de aa, está estructurado en ocho α helices. La primera región de este dominio va del extremo amino-terminal al aa 150 y del aa 335 al extremo carboxilo-terminal. El segundo dominio (superior), está formado por la región central de la proteína, que va del aa 151 al 334 (Fig.4) [19, 21,32]. Este dominio

superior tiene una estructura de jelly-roll formada por cadenas β -sandwich. Este tipo de topología es muy frecuente en proteínas virales que forman parte de la cápside. El dominio inferior, que es la base del trímero, está en contacto con la proteína VP2 a través de una región que contiene varios residuos de leucina y que se encuentra muy conservada entre las diferentes cepas de rotavirus. El dominio superior interacciona con VP7, que también se encuentra formando trímeros, siendo la interacción entre estos dos polipéptidos uno a uno [19, 31].

VP6 es una proteína que puede presentar diferentes interacciones consigo misma dependiendo de las condiciones del medio en el que se encuentra. Cuando en un sistema de baculovirus se expresa VP6 como proteína recombinante, se puede caracterizar su polimorfismo estructural variando las condiciones de pH y de iones como Ca^{2+} y Zn^{2+} . Las diferentes maneras como se asocia VP6 cuando se varía el pH del medio indica que el estado de protonación de la proteína define sus interacciones y el tipo de ensamblaje. Así, a pH entre 3 y 5.5 se forman partículas esféricas que tienen aproximadamente un diámetro de 75 nm, similar al que presentan las DLPs [16]. A pH entre 5.5 y 7 se forman unas estructuras tubulares largas y gruesas, mientras que las estructuras tubulares que se forman a pH 7 tienen la misma geometría, pero son más cortas y delgadas [16]. También se sabe que cuando se tiene una concentración por arriba de 200 mM de Ca^{2+} o Zn^{2+} se ven afectadas las interacciones intertriméricas, perdiéndose las estructuras más complejas, quedando sólo las interacciones de los trímeros, que es la forma en la que se puede encontrar a VP6 en la partícula viral [16].

El dominio de VP6 responsable de la formación de trímeros se ha determinado en ensayos de trimerización utilizando mutantes por delección de la proteína. El dominio está formado por los aa 105 al 328 [1]. Sin embargo, se ha visto que mutaciones puntuales en los residuos 251 y 309 [17, 26], donde se cambia una prolina por un ácido aspártico, provocan que la proteína pierda

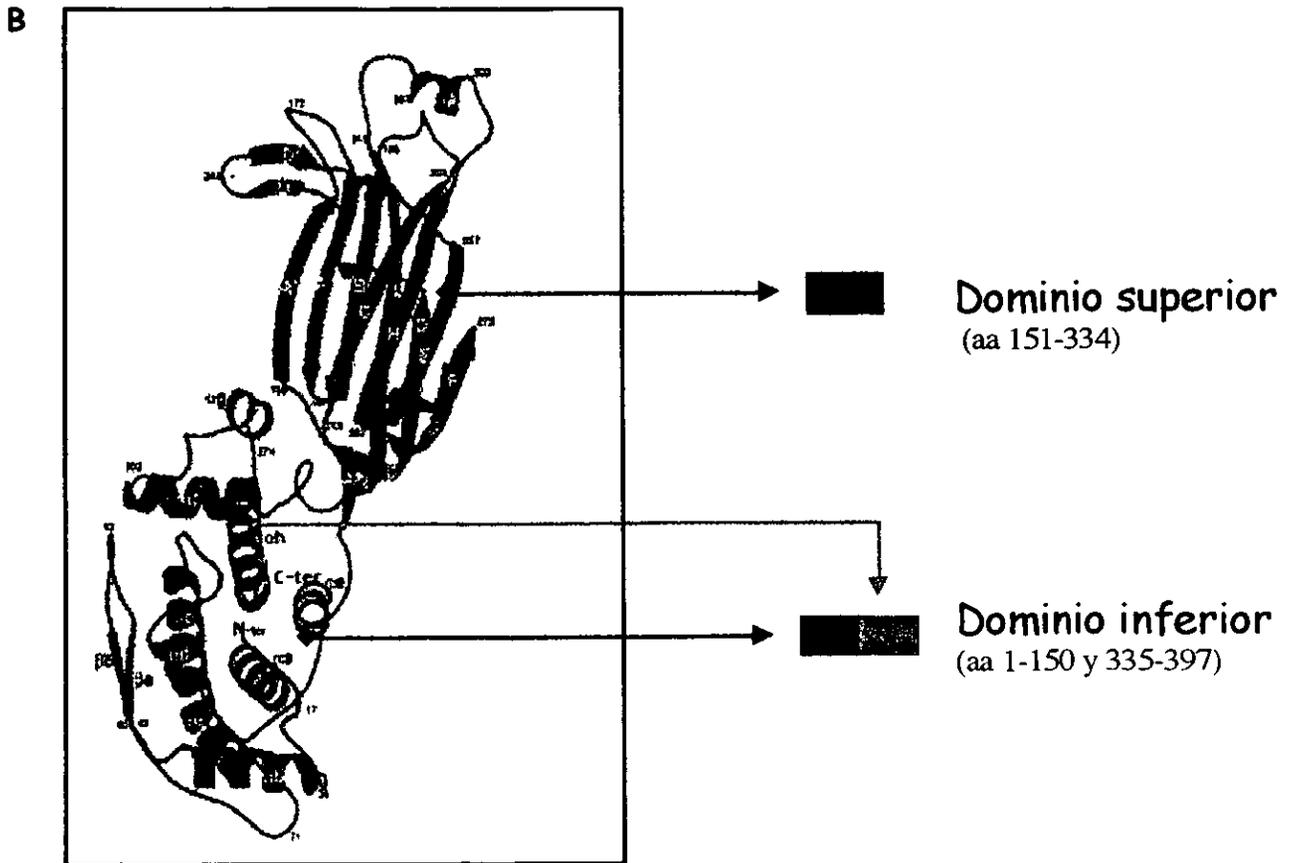
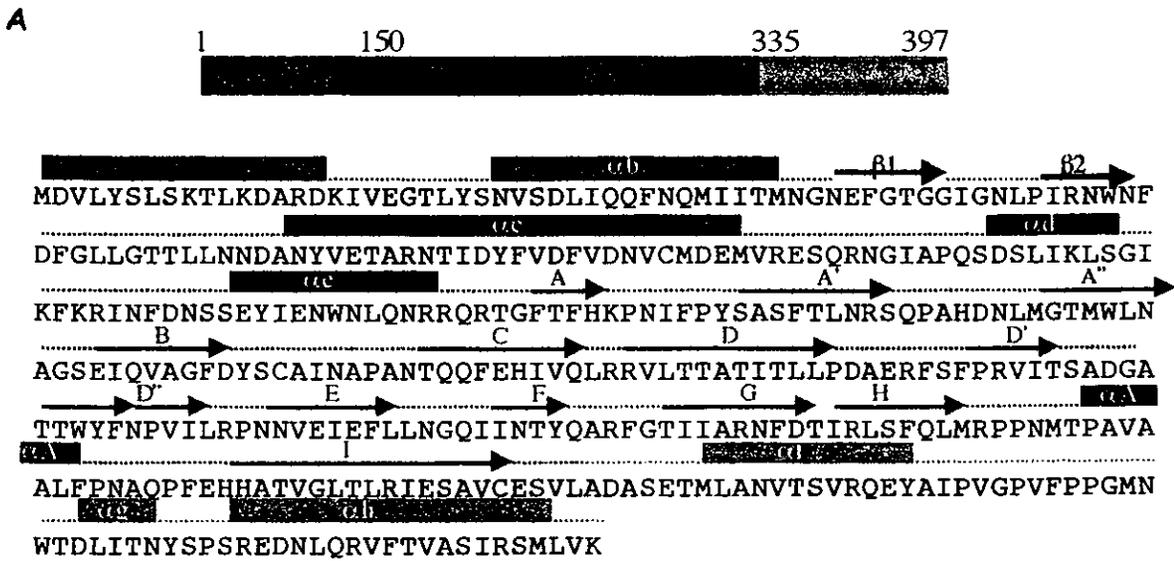


Fig. 4. A) Representación lineal de cada dominio y secuencia primaria de la proteína VP6. B) Localización de los dominios en un esquema de la estructura monomérica de VP6 [19].

su capacidad de trimerizar. Se cree que las prolinas de cada uno de los monómeros participa en la formación de un anillo que le da estabilidad al trímero [19].

Cuando se expresan en células de insecto las proteínas VP2 y VP6, a partir de baculovirus recombinantes, estas dos proteínas se ensamblan para formar partículas similares a DLPs. Utilizando este sistema, y mutantes por delección de VP6, se determinó que el dominio que requiere esta proteína para poder ensamblarse con VP2 va del aminoácido 251 al 397, localizado en el dominio inferior de la proteína [8].

VP6 juega un papel importante en la organización del virión, ya que está en contacto tanto con las proteínas de la capa externa, VP4 y VP7, como con VP2, de la capa interna, actuando por lo tanto como un "adaptador físico" en la estructura de la partícula madura [19]. Cuando VP6 está ensamblada en la partícula, los trímeros se agrupan en pentámeros y hexámeros, lo cual hace que se forme el sistema de canales que están en registro en las tres capas de proteínas y conectan el interior de la partícula con el medio externo (Fig. 5). La interacción de VP6 con VP4 se da en los canales tipo II, ya que ésta última proteína se encuentra anclada al virión a través de estos canales (Ver criomicroscopía electrónica figura 1) [23, 24].

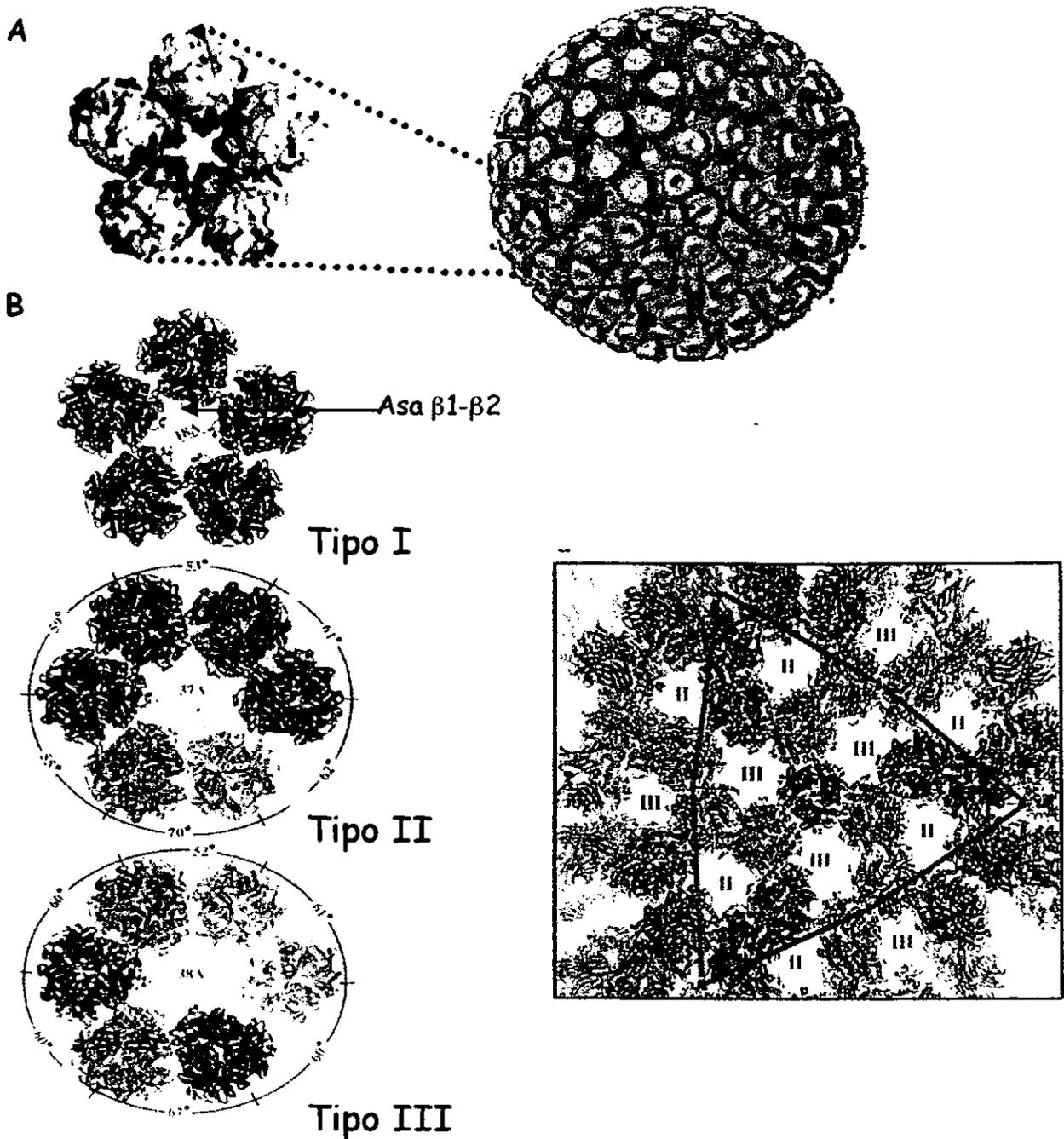


Fig. 5. A) A la derecha se observa una criomicroscopía electrónica de una DLP, donde se señalan los tres tipos de canales y a la izquierda la amplificación de un canal tipo I, representado en color rojo el potencial electrostático negativo y en azul el positivo. B) Vista de los tres tipos de canales, cada color indica interacciones distintas entre cada grupo de trímeros. A la derecha la organización de la capa de VP6 en la partícula. La línea negra señala una cara del icosaédro. A la izquierda una amplificación de cada canal donde se puede ver al centro de los canales el asa $\beta 1-\beta 2$ [19].

Transcripción viral

Existe evidencia de que VP6 tiene un papel importante en la maquinaria de transcripción viral y que éste es un papel estructural más que funcional, ya que la actividad de polimerasa la tiene la proteína VP1 [2, 5, 18].

Las partículas completas con tres capas de proteínas (virus maduros), no tienen actividad de transcripción, pero cuando el virus entra a la célula pierde la capa externa formada por VP4 y VP7, y se activa la transcripción viral. De igual manera, *in vitro* la partícula completa no muestra actividad de transcripción, mientras que las DLPs sí son capaces de sintetizar mensajeros virales [6, 15].

Se ha visto también que si a los cores virales, que no tienen actividad de transcripción, se les agrega la proteína VP6 expresada en un sistema de baculovirus, se recupera la actividad transcripcional. La proteína VP6 de los rotavirus del grupo C tiene una identidad con la proteína VP6 del grupo A del 40%. Sin embargo, la proteína VP6 de grupo C expresada en baculovirus se une en forma de trímeros a los cores del grupo A, y la morfología de las partículas es la misma que las de las silvestres de grupo A. Estas partículas híbridas (VP2 del grupo A con VP6 de grupo C) no muestran actividad de transcripción [11, 29].

En DLPs transcripcionalmente activas, se observó por criomicroscopia electrónica que el RNA mensajero que se genera en el interior de la partícula se transloca hacia el exterior por los canales tipo I (Fig. 6), los cuales se encuentran en los doce vértices, coincidentes con los ejes de simetría de 5, donde también se ha visto que se localizan los complejos de VP1 y VP3 en el interior de los viriones [22, 24]. Se sabe que la translocación de la cadena nascente del RNA mensajero es crítica para que la elongación y la terminación de la transcripción sean eficientes. Se ha visto que algunos anticuerpos monoclonales dirigidos contra VP6, como RV238, 2A11 y E9 [12,28], inhiben la transcripción del virus y

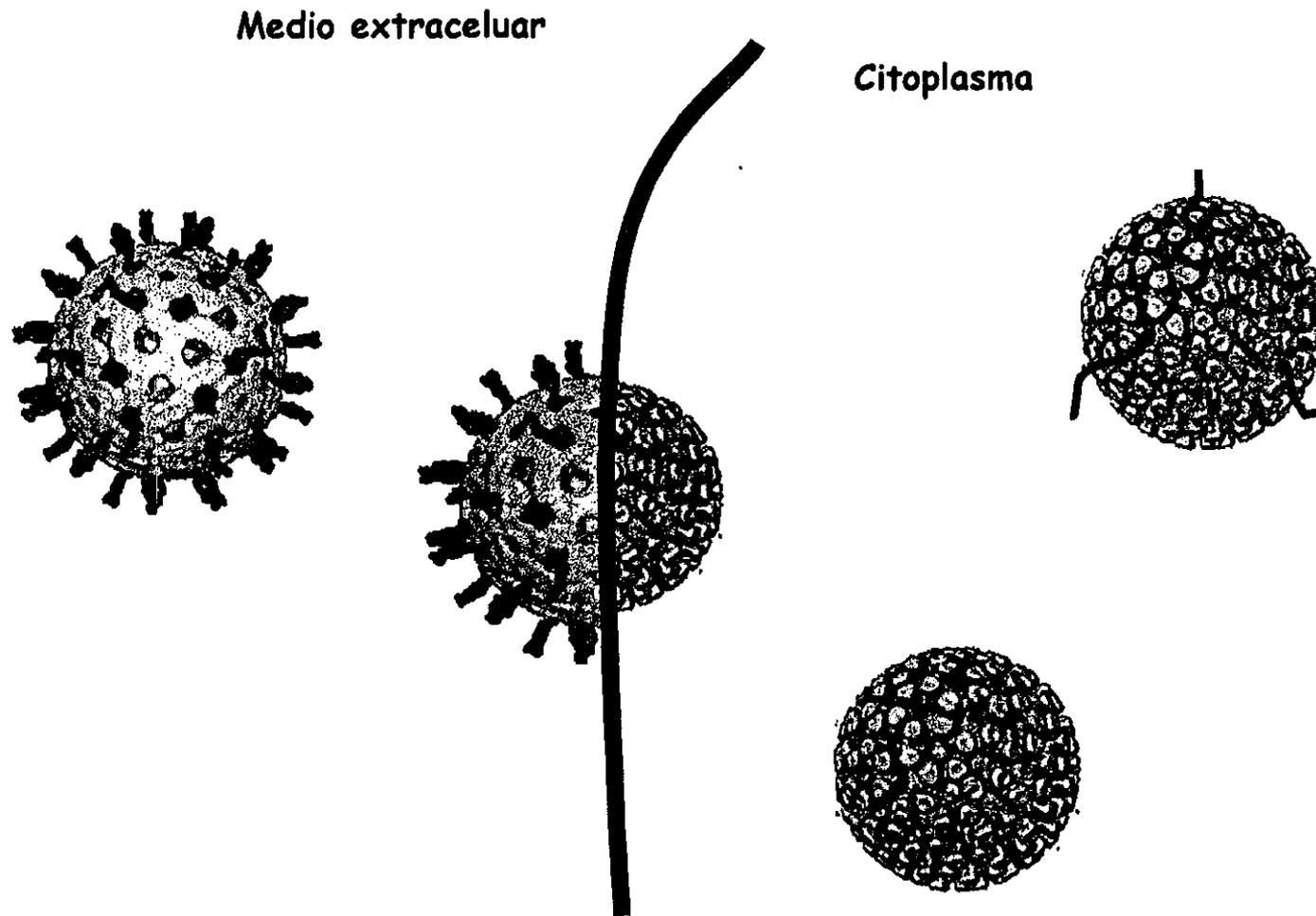


Fig. 6. Representación esquemática de la activación de la transcripción, utilizando imágenes de criomicroscopía electrónica. Primero se tiene una TLP que cuando entra a la célula pierde las proteínas de la capa externa, quedando las DLP's y activándose la transcripción del virus.

por criomicroscopía se ha determinado que estos anticuerpos reducen el diámetro de los canales tipo I, por los que se transloca el RNA naciente, con la consecuente inhibición de la transcripción viral [14, 29].

El interior de los canales formados por VP6 tiene un potencial electrostático negativo, que se cree es importante para la translocación de los mensajeros hacia el exterior de la partícula [19]. Hacia el interior de los canales de VP6 se proyecta una asa (asa $\beta 1$ - $\beta 2$), la cual está flanqueada por dos estructuras β (Fig. 4) cuya secuencia de aminoácidos está altamente conservada entre diferentes cepas de rotavirus, incluso pertenecientes a diferentes grupos (A y C). Esta asa es la responsable del potencial negativo de los canales [19].

Con la hipótesis de que el asa $\beta 1$ - $\beta 2$ le confiere el potencial electronegativo a los canales, y que este potencial es necesario para la salida de los mensajeros, en un trabajo anterior se expresaron en el sistema de baculovirus en células de insecto, proteínas VP6 con mutaciones puntuales que sustituían los aminoácidos que contribuyen al potencial negativo del asa. Estas proteínas recombinantes se ensamblaron en cores virales, para evaluar si estas mutaciones afectaban la actividad de transcripción *in vitro* de las DLPs reconstituidas. Sin embargo, la actividad de transcripción de estas partículas no se vió afectada con respecto a lo obtenido con la proteína VP6 silvestre (C. Arias resultados no publicados).

Estos resultados llevaron a la hipótesis de que sería necesaria el asa completa para una actividad transcripcional eficiente de la partícula viral. Para probar esta hipótesis en este trabajo se expresó en un sistema de baculovirus una proteína VP6 a la cual se le había deletado el asa $\beta 1$ - $\beta 2$ (Fig. 4 y 5, los aa 44 al 61). Esta proteína se ensambló en cores y se probó la actividad de transcripción *in vitro* de las partículas reconstituidas.

Por otro lado, se sabe que la proteína VP6 forma trimeros, y que mutaciones puntuales en las posiciones 251 y 309 [17, 26], en donde se cambia una prolina por ácido aspártico, provocan que la proteína pierda su capacidad de trimerizar. Para determinar si la trimerización está relacionada con el ensamblaje y con la transcripción del virus, se expresó en baculovirus una proteína VP6 mutante que ya no trimeriza y se evaluó su capacidad para ensamblarse en cores y reconstituir la actividad transcripcional de la partícula viral.

OBJETIVO

General

Determinar los dominios estructurales de VP6 relevantes para la actividad de transcripción viral.

Específicos

1. Expresar en un sistema de baculovirus en células de insecto, mutantes de la proteína VP6 que tengan el asa $\beta 1$ - $\beta 2$ truncada y/o que sean incapaces de trimerizar.
2. Ensamblar sobre cores virales las proteínas mutantes sintetizadas, para reconstituir partículas de doble capa.
3. Medir la actividad de transcripción *in vitro* de las partículas reconstituidas con las proteínas mutantes, para determinar el efecto de las mutaciones sobre la actividad de la transcripción viral.

MATERIALES Y METODOS

Mutagénesis dirigida del gen de VP6

El gen de VP6 que se usó en el presente trabajo es derivado de la cepa RF de rotavirus bovino, clonado por el grupo del Dr. Jean Cohen (11). Para hacer la mutagénesis dirigida el gen 6 de RF, presente en el plásmido pGEM-3Z, éste se subclona en el plásmido pFastBac, que se utiliza en el sistema de expresión de baculovirus para proteínas recombinantes (ver adelante).

Una vez que se tenía el gen 6 en el vector pFastBac, se empleó el método de mutagénesis sitio dirigidas por PCR (Reacción en Cadena de Polimerasa) de "quick change" (Stratagene), en el cual se utiliza la DNA polimerasa *Pfu*, que polimeriza con alta fidelidad. En este método se utilizan entre 5 y 10 ng de DNA superenrollado de doble cadena, 125 ng de cada uno de dos oligonucleótidos que sean complementarios entre sí, con una longitud de 25 a 45 bases y que contengan la delección o la mutación deseada, 5 μ l de buffer (10X), 1 μ l de mezcla de dinucleótidos 5 mM (dNTP's, Boheringer) y agua destilada para una reacción de un volumen final de 50 μ l, 1 μ l de polimerasa *Pfu* (2.5 U/ μ l) y 30 μ l de aceite mineral. La DNA polimerasa extiende los oligos, generando un plásmido mutante de doble cadena que contiene dos *nicks* o rupturas.

Las mutaciones realizadas sobre el gen 6 fueron: 1) una delección del asa β 1- β 2, donde se quitan los aa 44 al 61 y se introducen dos glicinas para conectar las hélices α b y α c (Fig. 4); 2) una mutación puntual en donde se sustituye una prolina por un ácido aspártico en la posición 309.

Oligos para la delección VP6/44-61: (39bases)

▶ Oligo 5' > 3'

GATAATTACTATGAATGGAGGAGATTTTGGATTACTTGG

▶ Oligo 3' > 5'

CCAAGTAATCCAAAATCTCCTCCATTCATAGTAATTATC

Oligos para la mutación VP6/P309D:(45 bases)

▶ Oligo 5' > 3'

GGTAGCGGCGTTATTTGACAACGCTCAGCCATTTGAACATCACGC

▶ Oligo 3' > 5'

GCGTGATGTTCAAATGGCTGAGCGTTGTCAAATAACGCCGCTACC

| Ciclos | Temperatura | Tiempo |
|--------|-------------|-------------|
| 1 | 95°C | 30 segundos |
| 12-18 | 95°C | 30 segundos |
| | 55°C | 1 minuto |
| | 68°C | 12 minutos |

Después de que se obtiene el producto de PCR se hace una digestión con la enzima *DpnI* que corta específicamente DNA metilado, por lo que se digiere únicamente el DNA silvestre que no tiene la mutación, el cual se encuentra metilado. Se agregó a la mezcla de PCR 1 µl de la enzima *DpnI* (10 U/µl) y se incubó por 1 hora a 37°C. Posteriormente se transformó el plásmido en células supercompetentes *Epicurian Coli XL1-blue* que reparan la ruptura del DNA mutante. Se hizo una mezcla de 1µl de DNA tratado con *DpnI* y 50 µl de células supercompetentes, se incubaron 30 segundos en hielo y después de dar un pulso de 45 segundos a 42°C, se incubaron otros 2 minutos en hielo, se incubó la mezcla con 500 µl de medio SOC (medio Luria, glucosa 2 M y MgCl₂ 2 M) 1 hora a 37°C y finalmente se plaquearon diferentes diluciones de la mezcla en cajas de

agar con ampicilina, que es la resistencia que tiene el plásmido, para así poder seleccionar las colonias que contienen el plásmido con la mutación.

Para verificar que el gen tenga la mutación deseada se utilizaron enzimas de restricción que generan patrones de migración diferenciales de los fragmentos del DNA mutante con los del silvestre. Para el caso de la mutante VP6/P309D, se quitó un sitio para la enzima *FspI* y se introdujo un sitio que no está presente en el silvestre para la enzima *BlnI*, por lo que estas enzimas permiten diferenciar el plásmido silvestre del mutante. Para la deleción 44-61 se utilizó la enzima *TaqI*, que corta ambos plásmidos, pero permite diferenciar un fragmento de restricción, que en el silvestre es de 177 bases y en la deleción de 127.

Generación de bácmidos recombinantes

Una vez que se corroboró que las construcciones tenían las mutaciones correctas, se generaron los baculovirus recombinantes utilizando el sistema de "Bac-to-bac" (Gibco). En este sistema se parte de un plásmido donador, el pFastBac, que contiene los genes mutantes clonados entre dos sitios de transposición y bajo el control del gen de la poliedrina. Las células en las que se transforma el plásmido son *E.coli DH10Bac* que tienen un bácmido (el genoma completo de **baculovirus**, mantenido como **plásmido** en la bacteria) con el gene de resistencia a kanamicina, el gene de *lacZ* y sitios blanco para transposición. Los bácmidos recombinantes se obtienen por transposición del gen de VP6 con el promotor de poliedrina, al bácmido, lo que provoca la interrupción del gen *lacZ*. Esto permite que los bácmidos recombinantes se seleccionen por pérdida de la actividad de β -galactosidasa utilizando su sustrato cromogénico, X-gal. Las bacterias que contienen el bácmido silvestre producen colonias azules, mientras que aquellas que contienen el bácmido recombinante generan colonias blancas.

Para lograr lo anterior se mezcló 1 ng de plásmido donador recombinante con 100 μ l de células *DH10Bac* y se incubó 30 minutos en hielo. Posteriormente se les da un choque térmico a 42°C por 45 segundos, se adicionan 900 μ l de medio SOC y se incubó 4 horas con agitación a 37°C. Finalmente, las bacterias transformadas se platan en cajas de agar con medio Luria conteniendo 50 μ g/ μ l de kanamicina, 7 μ g/ μ l gentamicina, 10 μ g/ μ l tetraciclina, 100 μ g/ μ l X-gal y 40 μ g/ μ l de IPTG. Se incuban las cajas por 24-48 horas a 37°C. Se hace una selección de 5 a 10 colonias positivas (blancas) y una negativa (azul) y se verifica el fenotipo replanteándolas en cajas de Luria iguales a las ya descritas. De allí se purifica el DNA del bácmido recombinante, el cual se va a utilizar para hacer la transfección en las células de insecto.

Generación de baculovirus recombinantes

La transfección del bácmido a las células de insecto Sf9 (de *Spodoptera frugiperda*) se hace por lipofección, utilizando celfectina (Gibco) como lípido catiónico. Se hacen dos mezclas en tubos de polietileno: en una, se mezclan entre 1 y 2 μ g del bácmido recombinante con 100 μ l de medio de cultivo SF900II (Gibco); en la otra mezcla, se tienen 7 μ l de celfectina con 100 μ l de medio SF900II. La mezcla de celfectina se añade lentamente a la mezcla del bácmido y se incubó 15 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se agregan 800 μ l más de medio. Esta mezcla de transfección se agrega a células Sf9 (6×10^5 células/pozo de una caja de 6 pozos) previamente adsorbidas por 1 h a 27°C y lavadas con medio SF900II, y las células se incuban por 5 horas a 27°C. Después se retira la mezcla de transfección de las células, se agregan 2 ml de medio y las células se incuban a 27°C por 72 horas. Pasado este tiempo se cosecha el sobrenadante (que contiene el virus recombinante) y a las células se les hace un ensayo de inmunotinción utilizando un anticuerpo policlonal contra rotavirus, para corroborar que se está expresando la proteína VP6 en las células de insecto.

En los ensayos de inmunotinción, se fijaron las células con formaldehído al 3.7% por 15 minutos, después se agregó Tritón X-100 al 5% por 10 minutos, posteriormente se agrega el anticuerpo policlonal antirotavirus (α YM, 1:2000) y se incubó 1 hora. Finalmente, se pone proteína A peroxidasa (Amersham) diluida 1:2500 también por 1 hora y después se revela con carbazole (3 ml de carbazole [0.8 g/200 ml de dimetilformamida], 9 ml de buffer de acetatos 0.5 M y 20 μ l de H₂O₂). Todas las incubaciones se hacen a 37°C y las diluciones al igual que los lavados entre cada incubación se hacen con PBS [NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄•7H₂O 4.3 mM y KH₂PO₄ 1.4 mM]

El baculovirus recombinante presente en el sobrenadante de la transfección se amplifica a través de varios pases en las células de insecto, con el fin de aumentar el título viral, y así tener una mayor concentración de virus que se pueda utilizar para una buena producción de proteína recombinante. Después de cada pase de amplificación de los lisados virales, se hace un ensayo de inmunotinción con el anticuerpo policlonal α YM para la eficiencia de infección, lo cual se refleja en una mayor cantidad de células infectadas después de cada pase. Cuando se tiene el virus con el que se va a producir la proteína recombinante, se extrae DNA del baculovirus y se hace un PCR con oligonucleotidos que nos permitan amplificar unicamente el gen de VP6. Una vez amplificado el gen de VP6 de cada uno de los cuatro bácmidos (VP6/wtA, VP6/44-61, VP6/P309D y VP6/wtC), se hicieron ensayos con las enzimas de restricción con las que se caracterizaron los fenotipos tanto del DNA silvestre como del mutante para confirmar que no se ha perdido la mutación o la deleción que se introdujo al gene de VP6. Una vez caracterizado, se utiliza ese lisado viral en una infección para producir cada una de las proteínas recombinantes.

Oligos que se utilizaron para amplificar el gene de VP6 del bácmido: (para grupo A)

▶▶ Oligo 5' > 3' ATGGATGTCCTGTACTCC

▶▶ Oligo 3' > 5' GTAGTCGCTCCGTCAGC

(para grupo C)

▶▶ Oligo 5' > 3' ATGTGCTTTTTTCCATTGCG

▶▶ Oligo 5' > 3' CCTCCTCCTGGGGATCAT

Para todos los casos se hizo el mismo ciclo de temperaturas y tiempos

| Ciclos | Temperatura | Tiempo |
|--------|-------------|-----------|
| 30 | 94° | 1 minuto |
| | 55° | 2 minutos |
| | 72° | 3 minutos |
| 1 | 72° | 7 minutos |

Enriquecimiento de las proteínas recombinantes producidas por el sistema de baculovirus

Las proteínas que se purificaron fueron VP6/wtA, VP6/44-61, VP6/P309D y VP6/wtC. Cuando se sintetizan en las células de insecto, estas proteínas permanecen asociadas a las células, *i.e.*, no son excretadas al medio extracelular [11, 25].

Después de infectar las células Sf9 con los baculovirus recombinantes y de incubar por 3 días a 27°C, se cosecharon las células del medio de cultivo centrifugando por 5 minutos a 1000 rpm. Se desechó el sobrenadante, y el botón celular se resuspende en 1 ml de medio SF900II, después se añade triclorofluorometano para extraer los lípidos de la membrana celular, dejando la proteína en el medio acuoso. La mezcla se agita por 2 minutos y se centrifuga por 5 minutos a 14000 rpm en una microcentrifuga Eppendorf. Se guarda la fase acuosa que es donde se encuentra la proteína VP6.

Como la proteína VP6 tiene la propiedad de formar estructuras poliméricas de alto peso molecular, estas pueden colectarse por centrifugación [25]. La fase acuosa de la extracción se separa en cuatro alícuotas de 500 μ l cada una y se centrifugan 15 minutos a 35000 rpm a 4°C, en una ultracentrifuga Beckman, utilizando el rotor TL100.2. El botón en el fondo del tubo, constituido principalmente por VP6, se lava una vez con agua y se vuelve a centrifugar en las mismas condiciones. Finalmente, se retira el sobrenadante de los tubos y las proteínas se mantienen a -70°C. La alícuota con la que se va a trabajar se resuspende en 50 μ l de agua.

Una vez que se tiene la proteína enriquecida, ésta se corre en un gel de acrilamida al 10%, el cual se tiñe con el colorante azul de Coomassie, para verificar el tamaño y la pureza de las proteínas VP6. Se hace al mismo tiempo un *Western blot* con las mismas muestras, utilizando el suero policlonal antirotavirus α YM (1:2000), revelando el complejo antígeno-anticuerpo con proteína A peroxidasa y carbazole como sustrato (ver arriba).

También se hizo un ensayo de *dot blot*, en donde se pusieron 5 μ l de proteína sobre una membrana de nitrocelulosa, se dejó secar la membrana con las muestras y después se bloqueó con BSA (albumina de suero bovino, Gibco) en PBS al 4%. La membrana se incubó 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo policlonal α YM (1:2000) en PBS, o con el anticuerpo monoclonal 255, que reconoce trímeros de la proteína VP6. Finalmente se incubó 1 hora con proteína A peroxidasa diluída 1:2500 y se reveló con carbazole.

Ensayos de trimerización de las proteínas

Para saber si las proteínas recombinantes mantienen su capacidad para trimerizar, se determinó la presencia de trímeros para cada proteína traducida *in vitro*, por electroforesis en gel de poliacrilamida.

A partir de las construcciones en pFastBac, se escindieron los genes de VP6/wtA, VP6/44-61 y VP6/P309D con EcoR1 y se clonaron en el vector pGEM-3Z. Este vector tiene promotores para las RNA polimerasas de los fagos T7 y SP6, lo cual permite sintetizar RNA mensajeros que pueden ser traducidos *in vitro*. Después de que se clonaron en el vector pGEM-3Z, se verificaron las mutaciones de los genes con enzimas de restricción.

Para los ensayos de transcripción y traducción *in vitro* se utilizó un sistema acoplado (TnT quick couple sytem, Promega). En este sistema se mezclan 0.5 ng/ μ l de plásmido (pGEM con cada uno de los genes mutantes), 20 μ l de TnT master mix y 2 μ l de ³⁵S-metionina (10 mCi/ml, NeN) y se incuban de 60 a 90 minutos a 30°C, tiempo durante el cual el gen se transcribe y el mRNA sintetizado se traduce, produciendo la proteína deseada.

Para determinar si las proteínas trimerizan, cada una de las proteínas se incubaron con buffer de muestra (50 mM tris pH 6.8, 2% SDS, 0.1% azul de bromofenol y 10% de glicerol) por 30 minutos a 37°C o por 3 minutos a 100°C, para detectar los trímeros y los monómeros respectivamente [17]. Los productos se analizaron en un gel de acrilamida al 10%. Después de que se corre el gel a una corriente constante de 12 mA, se fija con metanol y ácido acético al 10% por 90 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se lava tres veces con agua y se incuba 15 minutos con ácido salicílico 1M. El gel se seca 20 minutos a 80°C y se deja exponiendo sobre una placa fotográfica (Kodak Scientific Imaging Film, X-Omat).

Las proteínas sintetizadas también se analizaron en gel después de haber sido inmunoprecipitadas con el anticuerpo monoclonal 255, que reconoce a VP6. Para esto, los productos de la traducción se incubaron 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo 255 diluido 1:2000 en buffer RIPA (Tris 50mM pH 8.0, Tritón X-100 1%, SDS 0.1%, desoxicolato de sodio 1% y NaCl 150 mM). La mezcla se centrifugo 3 minutos a 14000 rpm y el sobrenadante se paso a un tubo

nuevo. A esta mezcla se le agregaron 25 μ l de proteína A sefarosa al 50 % en PBS y se incubo 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Después de la incubación se lava 2 veces con 1mg/ml de BSA en RIPA, y una tercera vez con RIPA solo, centrifugando entre cada lavado 2 minutos a 6000 rpm. Finalmente, el sedimento se resuspende en 20 μ l de buffer de muestra (ver arriba). De los 20 μ l, 10 se incuban 30 minutos a 37°C y los otros 10 se incuban 3 minutos a 100°C, para determinar la presencia de trimeros, como se describió anteriormente.

Obtención de DLPs y de cores

Para la obtención de DLPs y posteriormente de cores, se necesita generar un lisado de la cepa con la que se va a trabajar, que en este caso es la cepa RF, infectar células y purificar el virus por gradiente de CsCl. Para esto, se utilizan células MA104 (células epiteliales de riñón de mono), que crecen en Medio Mínimo Esencial de Eagle (MEM, Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, Gibco), a una temperatura de 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. El virus se incuba con tripsina 10 μ g/ml durante 30 minutos, después se adsorbe por 1 hora a 37°C sobre una monocapa de MA104. Pasado este tiempo se adiciona medio MEM sin suero y se incuban las células en las mismas condiciones en las que crecen, hasta ver un efecto citopático. Para purificar las partículas virales, las células se congelan y descongelan, después se centrifugan a 25000 rpm por 1 hora a 4°C en una centrifuga Beckman con el rotor SW28. El botón formado por las células se resuspende en buffer TNC (10 mM tris pH 7.5, 140 mM NaCl y 10 mM CaCl₂), y se añade triclorofluorometano para extraer los lípidos de la membrana celular, dejando las partículas virales en el medio acuoso, el cual se centrifuga 5 minutos a 6000 rpm en una centrifuga Eppendorf. La extracción se repite 4 veces.

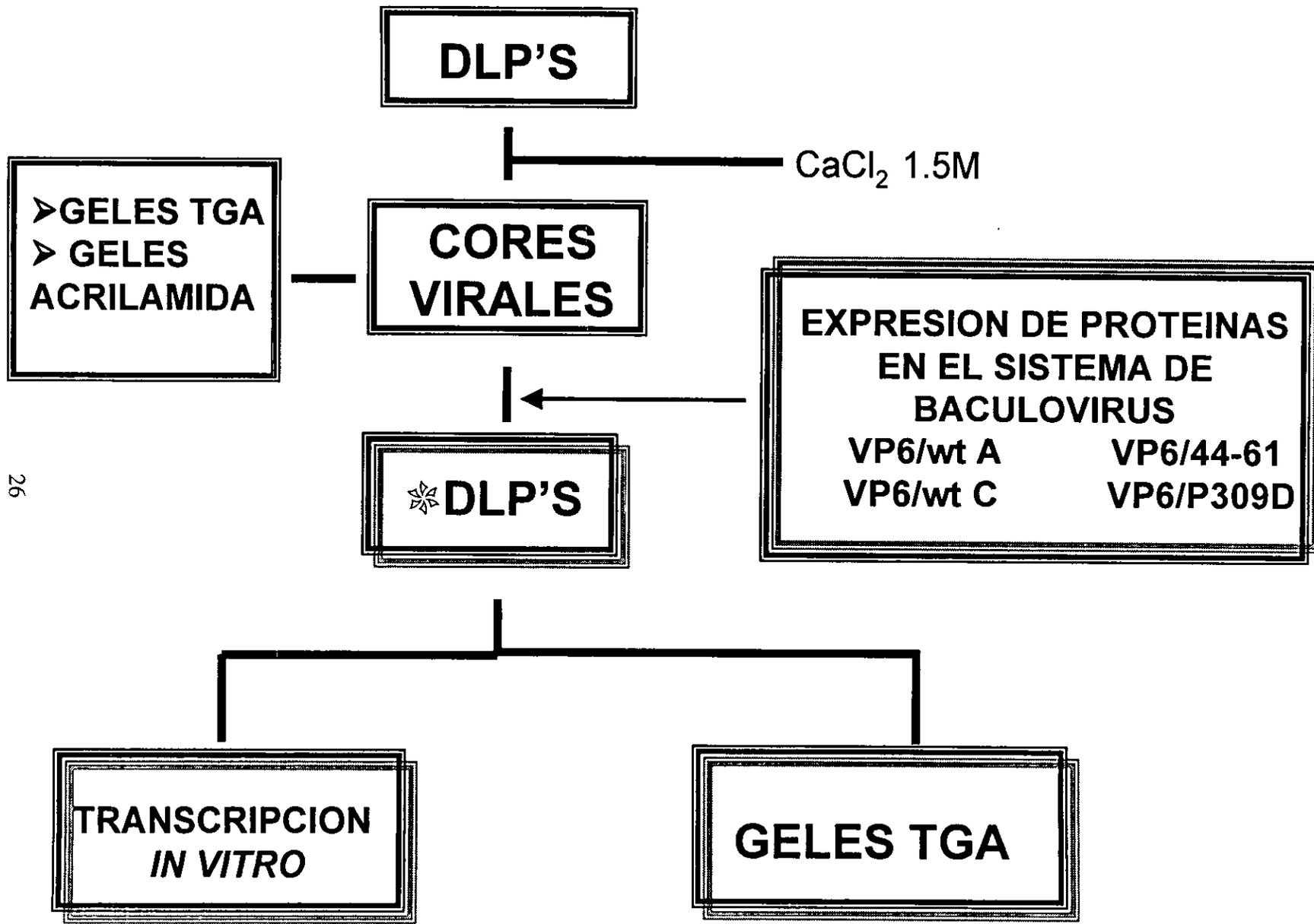


Fig. 7. Diagrama de flujo

El medio acuoso, el cual contiene el virus, se le agrega CsCl hasta tener una densidad de 1.36 g/ml y se centrifuga 18 horas a 36000 rpm en centrifuga Beckman con el rotor SW28.

En el gradiente se separan dos poblaciones de virus con diferente densidad, correspondiente a las partículas completas (TLPs) y las partículas de doble capa (DLPs). Se colectan ambas fracciones.

A partir de las DLPs se generan los cores, que posteriormente se van a reconstituir con las proteínas VP6 recombinantes expresadas en el sistema de baculovirus. Para remover el CsCl de las DLPs se utilizó una resina Sefadex G-25 (Sigma). Se pone la resina, previamente hidratada, en una columna, se lavó la resina dos veces con agua y después se pasaron las DLPs por esta columna, centrifugando la columna a 1000 rpm 20 segundos.

Los cores virales se obtienen cuando se remueve la VP6 de las DLPs, utilizando agentes caotrópicos [11]. En este caso se utilizó calcio en alta concentración para la generación de los cores virales. Las DLPs se incuban con CaCl_2 1.5 M y con Tris 25 mM pH 8.0 por 10 minutos a temperatura ambiente. La proteína VP6 que se desprende de la partícula y queda en solución, no es capaz de formar las estructuras poliméricas de alto peso molecular (previamente descritos) en presencia de esta concentración de calcio [16]. Por lo tanto, los cores se separan por ultracentrifugación a 40000 rpm por 10 minutos a 4°C, en una centrifuga Beckman con el rotor TL100.2. Después de centrifugar se retira el sobrenadante, que contiene la VP6, y los cores que forman un botón en el fondo del tubo se lavan con agua para quitar cualquier residuo de calcio y se vuelve a centrifugar en las mismas condiciones. Finalmente, el botón de cores se resuspende en agua [11, 29].

Para confirmar la generación de los cores, se monitorea la pérdida de VP6 en geles de acrilamida al 10%. Igualmente, las partículas íntegras, ya sean cores,

DLPs o TLPs, se analizan en geles de agarosa, en los cuales se puede ver una diferencia en la migración de estas partículas de acuerdo a su tamaño y carga. Los geles son de agarosa al 0.6% en MOPS (ácido 3-[N-morpholino]propansulfónico) 10mM a pH 7.1, los cuales se corren por 2 horas a 80 V y se tiñen con bromuro de etidio para detectar dsRNA del virus contenido en el interior de las partículas [13].

Reconstitución de DLPs con las proteínas recombinantes

Para la reconstitución de las DLPs con las proteínas recombinantes, se mezclan los cores con la proteína en presencia de EGTA 10 mM y se incuban por 30 minutos a temperatura ambiente. La reconstitución se llevó a cabo con diferentes cantidades de cada una de las proteínas, de acuerdo al siguiente esquema:

| CORES(μ l) | VP6(μ l) | EGTA(μ l) | H2O(μ l) | Total |
|----------------------|----------------------|----------------|---------------|-------|
| 5(\sim 2 μ g) | 1(\sim 1 μ g) | 1 | 8 | 15 |
| 5 | 2.5 | 1 | 6.5 | 15 |
| 5 | 5 | 1 | 4 | 15 |
| 5 | 7.5 | 1 | 1.5 | 15 |
| 5 | 10 | 1 | - | 15 |

Del total de 15 μ l de cada una de estas mezclas se tomaron 5 μ l para hacer geles de agarosa, para comparar la migración de las partículas reconstituidas, con la migración de las DLPs silvestres y los cores, y así saber si las proteínas recombinantes se están ensamblando en los cores o no. Con los 10 μ l restantes se hace el ensayo de transcripción *in vitro*.

Ensayos de transcripción *in vitro*

Los ensayos de transcripción *in vitro* con las partículas reconstituidas con las proteínas recombinantes se llevaron a cabo en una mezcla de reacción que contiene Tris 100 mM pH 7.7, ATP, GTP y CTP 50 mM, UTP 1 mM (Amersham-Pharmacia), MgCl₂ 15 mM, DTT 1.4 mM, RNasin 40 U/μl (Promega), ³H-UTP 1μCi/μl (NEN) y 10 μl de DLPs reconstituidas. De esta mezcla, en un volumen final de 50 μl, se toman 10 μl y se dejan a 4°C, como el tiempo cero de la reacción de transcripción. Los 40 μl restantes se incuban a 40°C por 1 hora. Como controles positivo y negativo se usaron DLPs silvestres y cores, respectivamente [11, 29].

Para la cuantificación de la actividad transcripcional de las partículas, se colocaron 10 μl de reacción sobre papel filtro de fibra de vidrio (125 mm GF/C Whatman), se deja hasta que se seque la muestra y se incuba 5 minutos a 4°C con ácido tricloroacético (TCA) al 5% para precipitar los transcritos sintetizados. Después se hacen dos lavados a temperatura ambiente con TCA al 5% para quitar el ³H-UTP que no se incorporó, y finalmente se incuban los filtros 10 minutos en etanol al 95% y se dejan secar. El papel filtro se pone en un vial que contiene 3 ml de líquido de centelleo (EcoLite, ICN) y se detecta la radioactividad incorporada en un contador de centelleo (Beckman) de los rayos β.

RESULTADOS

Mutagénesis dirigida del gen de VP6 y generación de los baculovirus recombinantes.

Para llevar a cabo la mutagénesis dirigida, el gen que codifica para la proteína VP6 completa del rotavirus RF se clonó en el vector pFastBac, el cual se utilizó para expresar las proteínas VP6 recombinantes en el sistema de baculovirus. Utilizando el método de *quick change* (Stratagene), se generaron dos proteínas mutantes. La primera VP6/P309D, tiene una mutación puntual, en la cual se sustituyó la prolina en la posición 309 por ácido aspártico. La segunda mutante, VP6/44-61, contiene una deleción del asa $\beta 1$ - $\beta 2$, que va de los aminoácidos 44 al 61. Se confirmó la presencia de las mutaciones digiriendo los plásmidos con enzimas de restricción. Para la mutante VP6/P309D, la mutación hizo que se perdiera el sitio de corte para la enzima *FspI*, que sigue estando presente en la silvestre. En el caso de la mutante VP6/44-61, la deleción provoca que un fragmento de 177 pb generado con la enzima *TaqI* reduzca su tamaño a 127 pb (Fig. 8).

La inserción de los genes mutantes de VP6 en el genoma de baculovirus se hace por transposición en bacteria. Los plásmidos pFastBac-VP6 generados contienen el gen de VP6 bajo el promotor de poliedrina, flanqueado por secuencias de transposición. Estos plásmidos se utilizaron para transformar la cepa *E.coli DH10Bac*, la cual contiene el bácido, esto es, el genoma completo de baculovirus, el cual se mantiene en la bacteria como plásmido. Dentro de la bacteria transformada se da la transposición del gen 6 de rotavirus al genoma del baculovirus, interrumpiéndose durante este proceso el gen de la β -galactosidasa presente en el virus. Esto permite la selección de

las bacterias donde ocurrió la transposición, las cuales portan virus recombinante.

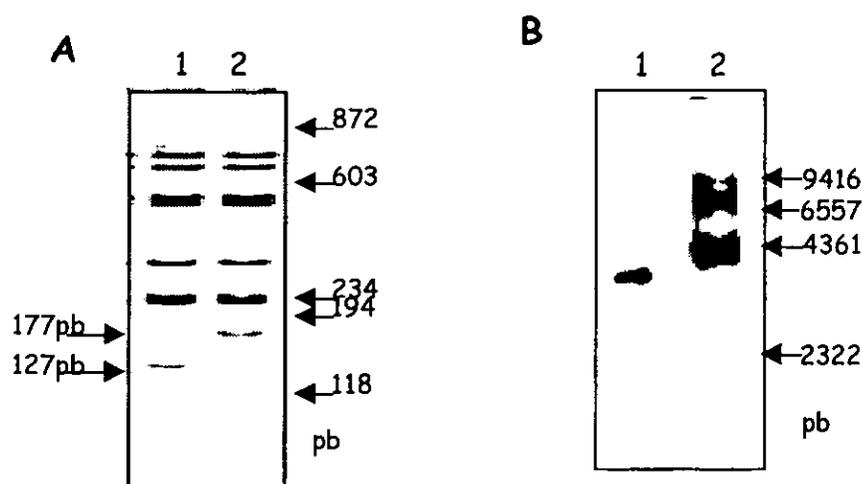


Fig. 8. Caracterización de las mutantes en pFastBac, con enzimas de restricción. A) gel de poliacrilamida al 12% teñido con bromuro de etidio, en donde se digirieron los dos plásmidos con *TaqI*, 1) pFastBac/VP6/44-61, 2) pFastBac/VP6/wtA. B) gel de agarosa teñido también con bromuro de etidio: 1) pFastBac/VP6/wtA digerido con *FspI*, 2) pFastBac/VP6/P309D digerido con *FspI*.

A partir de esta bacteria se extrae el bÁcmido, el cual se usa para transfectar células de insecto. Después de la transfección se verificó la expresión de la proteína VP6 recombinante a través de un ensayo de inmunotinción, utilizando un anticuerpo policlonal contra rotavirus (Fig. 9).

Finalmente, el baculovirus recombinante presente en el sobrenadante de la transfección se amplificó a través de varios pases en las células de insecto.

Los baculovirus que expresan las proteínas VP6 silvestres de los grupos A y C, se obtuvieron del laboratorio del Dr. Jean Cohen (INRA, Francia).

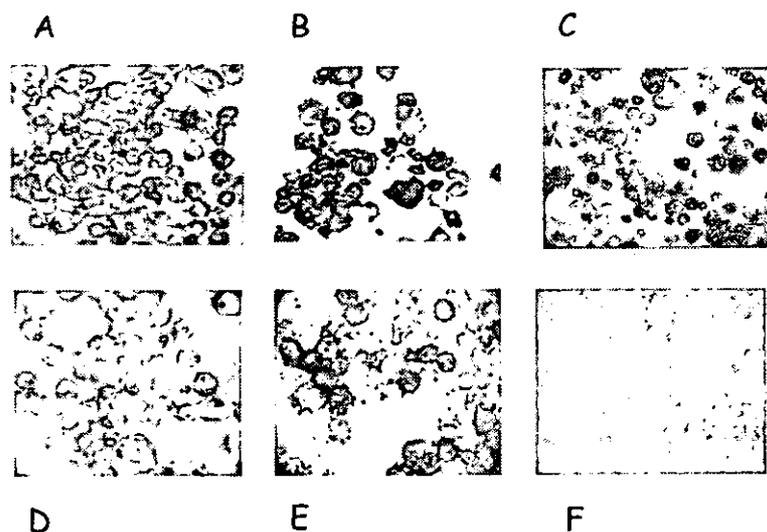


Fig. 9. Células de insecto, infectas con los diferentes baculovirus recombinantes, teñidas con el anticuerpo policlonal contra rotavirus, α YM (1:2000). A)VP6wtA, B)VP644-61, C)VP6309D, D)VP6wtC, E)VP7 como control positivo y F) células no infectadas.

Para confirmar que los baculovirus recombinantes expresaran las proteínas VP6 con la mutaciones indicadas, se extrajo DNA de cada uno de los virus y el gen de VP6 se amplificó por PCR. Los productos de PCR se caracterizaron por digestión con enzimas de restricción, de manera similar a como se habían caracterizado los plásmidos pFastBac originales.

El producto de la mutante 44-61 se digirió con la enzima *TaqI* y los fragmentos obtenidos se compararon con los del silvestre, encontrándose una diferencia de 50 nt en uno de los fragmentos, debido a la delección que tiene el gen del mutante (Fig. 10A). Para el producto de la mutante P309D (1112 pb) se utilizó la enzima *FspI*, cuyo sitio de corte se perdió con la mutación, pero que en la silvestre sigue presente, generando un fragmento de 926 nt (Fig. 10B). Para ver la diferencia entre los genes de los grupos A y C se utilizó la enzima *PstI*, que reconoce un sitio en el gen de grupo A y no en el gen de grupo C, obteniéndose fragmentos de 979 y 1310 pb, respectivamente (Fig. 10B). Los resultados corroboran la identidad de los baculovirus que expresan tanto las

proteínas VP6 silvestre de los grupos A y C, como la de las VP6 mutantes VP6/P309D y VP6/44-61.

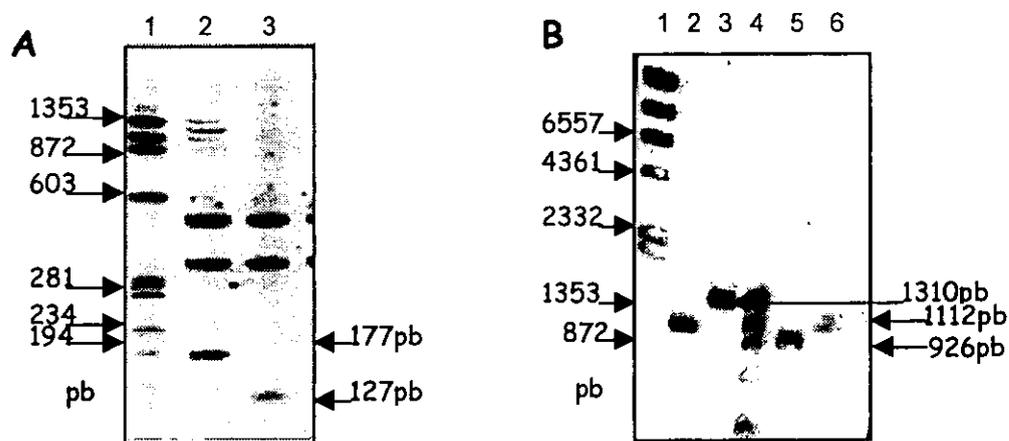


Fig. 10. Se extrajo el DNA de los cuatro baculovirus recombinantes y se amplificó el gen de VP6 de cada uno. Posteriormente se hicieron digestiones con diferentes enzimas para confirmar los fenotipos de cada uno. En A, un gel de acrilamida al 12% teñido con bromuro de etidio, donde los productos amplificados de wtA y 44-61 se digirieron con la enzima *TaqI*. 1) marcador de peso molecular ϕ X174 digerido con *HaeIII*, 2) wtA, 3) 44-61. En B, un gel de agarosa 0.8% teñido con bromuro de etidio. Marcadores de peso molecular 1) λ HindIII y 4) ϕ X174, 2) wtA digerido con *PstI*, 3) wtC digerido con *PstI*, 5) wtA digerido con *FspI* y 6) P309D digerido con *FspI*.

Enriquecimiento de las proteínas recombinantes

Para producir la proteína que sería empleada en la reconstitución de DLPs, se infectaron células Sf9 con cada uno de los baculovirus recombinantes. Tres días después de haber sido infectadas, las células se cosecharon y se resuspendieron en 1ml de medio.

La proteína VP6 se liberó de las células, extrayendo la suspensión celular con triclorofluorometano, el cual solubiliza las membranas. La VP6,

presente en la fase acuosa, se enriqueció por ultracentrifugación, aprovechando la propiedad de esta proteína de formar estructuras tipo tubulos de alto peso molecular.

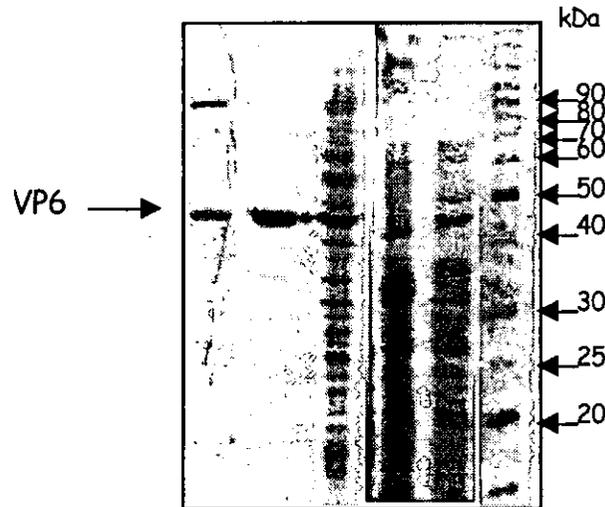


Fig. 11. Gel de acrilamida al 10% teñido con azul de Coomassie de las proteínas expresadas en baculovirus enriquecidas. 1)DLPs, 2)VP6/wtA, 3)VP6/wtC, 4)VP6/44-61, 5)VP6/P309D y 6)marcador de peso molecular.

El grado de enriquecimiento y el peso molecular (~42 kDa) de las proteínas obtenidas se analizó por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 10% y tinción con azul de Coomassie (Fig. 11). Para verificar la identidad de las proteínas se hicieron ensayos de *western blot* con el anticuerpo policlonal antirotavirus (α YM). A pesar de que este anticuerpo reconoció a las proteínas en los ensayos de inmunotinción de las células Sf9 infectadas, en el inmunoblot sólo reconoce la proteína silvestre de grupo A (Fig. 12A). En un ensayo de *dot blot* con el anticuerpo monoclonal 255, que reconoce VP6, se pudieron detectar, con diferente intensidad, tanto la proteína VP6 silvestre del grupo A como las mutantes VP6/44-61 y VP6/P309D (Fig. 12B). La única proteína que no se reconoce con estos anticuerpos es la proteína silvestre de grupo C, de acuerdo a lo esperado, ya que las proteínas de los grupos A y C no

cruzan antigénicamente. Igualmente, no dió reacción la proteína VP7 expresada en baculovirus, la cual se utilizó como control negativo.

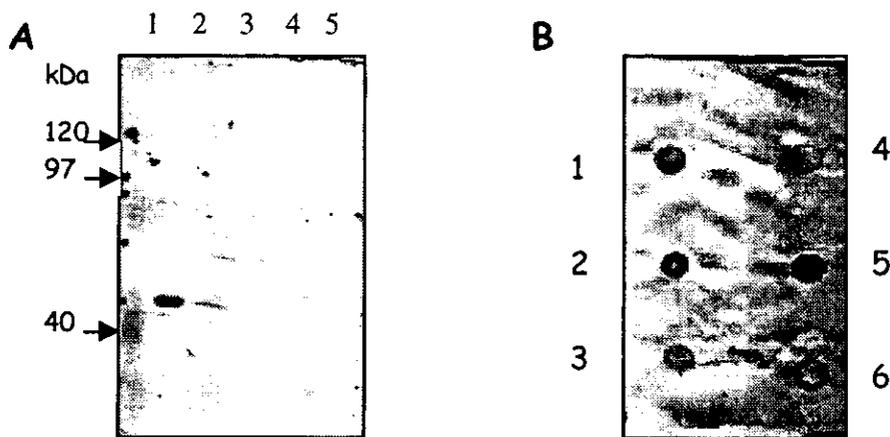


Fig. 12. En A, un *western blot* revelado con el anticuerpo policlonal α YM (1:2000), 1)DLP's, 2)VP6/wtA, 3)VP6/44-61, 4)VP6/P309D, 5)VP6/wtC. En B, un *dot blot* revelado con el anticuerpo monoclonal 255 (1:2500), 1)DLP's, 2)VP6/44-61, 3)VP6/wtC, 4)VP7, 5)VP6/wtA y 6)VP6/P309D.

Análisis de la capacidad de formar trímeros de las proteínas VP6 recombinantes

Para determinar si las proteínas mutantes son capaces de trimerizar. Los genes silvestres y mutantes de VP6, clonados en el vector pGEM3Z, bajo el promotor de la RNA polimerasa del fago T7, se utilizaron para programar un sistema acoplado de transcripción-traducción *in vitro*. Las proteínas sintetizadas se inmunoprecipitaron con el anticuerpo monoclonal 255, el cual reconoce las formas monómerica y trimerica de la proteína VP6. Las proteínas inmunoprecipitadas se resuspendieron en buffer de muestra y se incubaron 30 min a 37°C o 3 min a 100°C. La incubación a 37°C preserva los trímeros, mientras que la incubación a 100°C los disocia en monómeros. Finalmente,

las proteínas así tratadas se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida (Fig. 13).

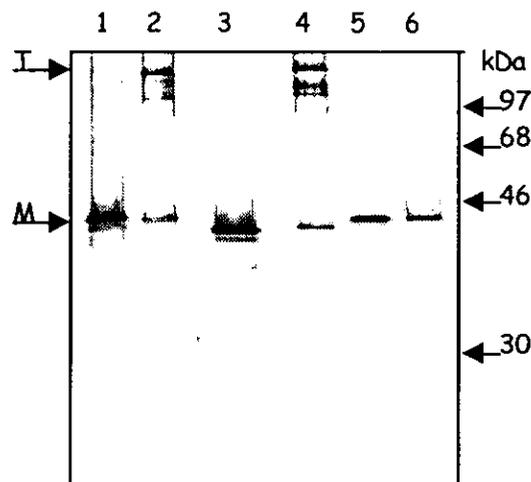


Fig.13. Análisis por electroforesis *in vitro*: 1)VP6/wtA a 100°C , 2) VP6/wtA a 37°C, 3) VP6/44-61 a 100°C, 4) VP6/44-61 a 37°C, 5)VP6/P309D a 100°C, 6)VP6/P309D a 37°C. Se muestra la inmunoprecipitación de los productos de la traducción con el anticuerpo monoclonal 255. La T indica la posición de los trímeros y la M la de los monómeros.

La inmunoprecipitación de la traducción *in vitro*, con el anticuerpo monoclonal 255, analizado como se describe arriba, se muestra en la figura 13. En el gel se puede observar que existe una diferencia en la migración de la proteína VP6/44-61 en relación a la silvestre, debido a la delección que tiene. Igualmente, se puede observar que las proteínas VP6/wtA y VP6/44-61 sí trimerizan, mientras que la proteína VP6/P309D perdió su capacidad de hacerlo (Fig. 13).

Obtención de cores virales

Las partículas virales con doble capa (DLPs), purificadas en gradiente de cloruro de cesio, se utilizaron para generar los cores virales, formados por una sola capa de proteínas. Después de quitar el CsCl, utilizando columna de Sefadex G25, las DLPs se trataron con calcio 1.5 M por 10 minutos. Este tratamiento disocia la VP6 de la partícula, obteniéndose los cores virales, los que se utilizaron para la reconstitución de las DLPs con las proteínas recombinantes.

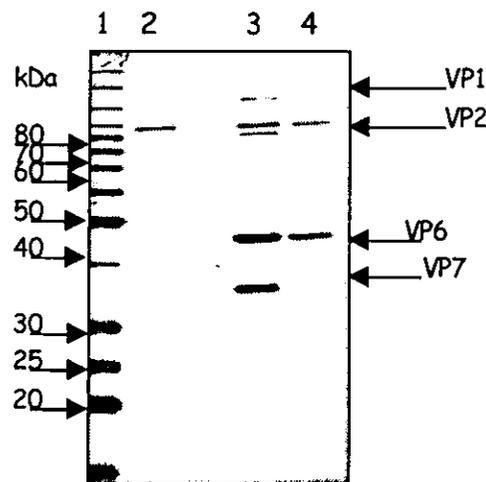


Fig. 14. Gel de acrilamida 10% teñido con azul de Coomassie. En el carril 1) marcadores de peso molecular, 2)Cores generados por el tratamiento de DLPs con calcio, 3)TLPs y 4)DLPs. Todos las partículas son de la cepa de rotavirus bovino RF.

En la figura 14 se puede observar la composición de proteínas de las TLPs (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 y VP7) (carril 2), de las DLPs (VP1, VP2, VP3 y VP6) (carril 1), y de los cores (VP1, VP2 y VP3) generados por el tratamiento de las DLPs con calcio (carril 3).

Otra forma en la que se vió la diferencia entre las partículas y que posteriormente sirvió para verificar la reconstitución de las DLPs con las proteínas recombinantes, fue por su migración en geles de agarosa (en buffer MOPS). En este sistema de geles, las partículas virales se pueden separar en función de su tamaño, y se pueden detectar por tinción del RNA viral con bromuro de etidio (Fig. 15).

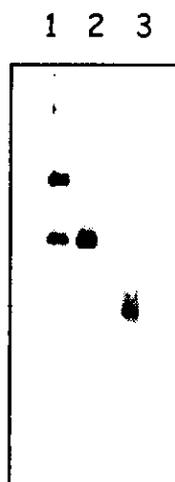


Fig. 15. Gel de agarosa 0.6% en buffer MOPS 10 mM pH 7.1, teñido con bromuro de etidio. En el carril 1)TLP's, 2)DLP's y 3) cores.

Reconstitución de DLPs

Con las proteínas recombinantes purificadas y los cores, se hicieron los ensayos de reconstitución de DLPs. Se probaron diferentes cantidades de las proteínas recombinantes para determinar si la formación de las DLPs aumentaba con el incremento de la proteína añadida. Esto se hizo para encontrar las condiciones óptimas para la mejor reconstitución de las DLPs, evitando que la baja cantidad de proteína fuera la causante de que no se diera el ensamble y posteriormente la activación de la transcripción viral.

Para determinar la formación de DLPs a partir de las proteínas recombinantes y los cores, las partículas reconstituidas se analizaron por geles de agarosa (en buffer MOPS), teniendo como marcadores de migración las DLPs silvestres y los cores (2 μ g de cada uno). En la figura 16A se muestra un ensayo de reconstitución utilizando la proteína VP6/wtA, en donde podemos observar que si hubo reconstitución, ya que las partículas ensambladas migran a la altura de las DLPs silvestres y no a la de los cores, a los cuales no se les añadió proteína recombinante. Se puede también observar que no se ve una diferencia en la intensidad de las bandas conforme al aumento de la cantidad de proteína (de 1 hasta 10 μ g), lo que implica que no hay una mayor cantidad de DLPs reconstituidas y que con la menor cantidad de proteína añadida (1 μ g) se reconstituyen todos los cores para formar DLPs. Esto se observó con todas las proteínas recombinantes probadas. En la figura 16B podemos ver que la proteína VP6/44-61 también fue capaz de ensamblarse, ya que las partículas reconstituidas migran como las DLPs silvestres.

Después del ensayo de reconstitución con la proteína VP6/P309D, las partículas siguen migrando en la posición de los cores, lo cual indica que esta proteína VP6 mutante no es capaz de ensamblarse en los cores para formar DLPs (Fig.16C).

Finalmente, en la figura 16D se puede observar que la proteína silvestre del grupo C si fue capaz de ensamblarse en los cores de grupo A.

Actividad transcripcional de las DLPs reconstituidas

Con una fracción de las mismas muestras analizadas por geles de agarosa se hicieron los ensayos de transcripción *in vitro*, para determinar la actividad transcripcional de las partículas reconstituidas.

En la figura 17 se muestra el promedio de cuatro experimentos (cada uno hecho por duplicado) de las actividades de transcripción que se obtuvieron con las partículas reconstituidas con las diferentes proteínas, referido el porcentaje de actividad (100%) que tiene las DLPs silvestres. Se incluyó también, como control negativo, la actividad que presentan los cores, también en relación a las DLPs.

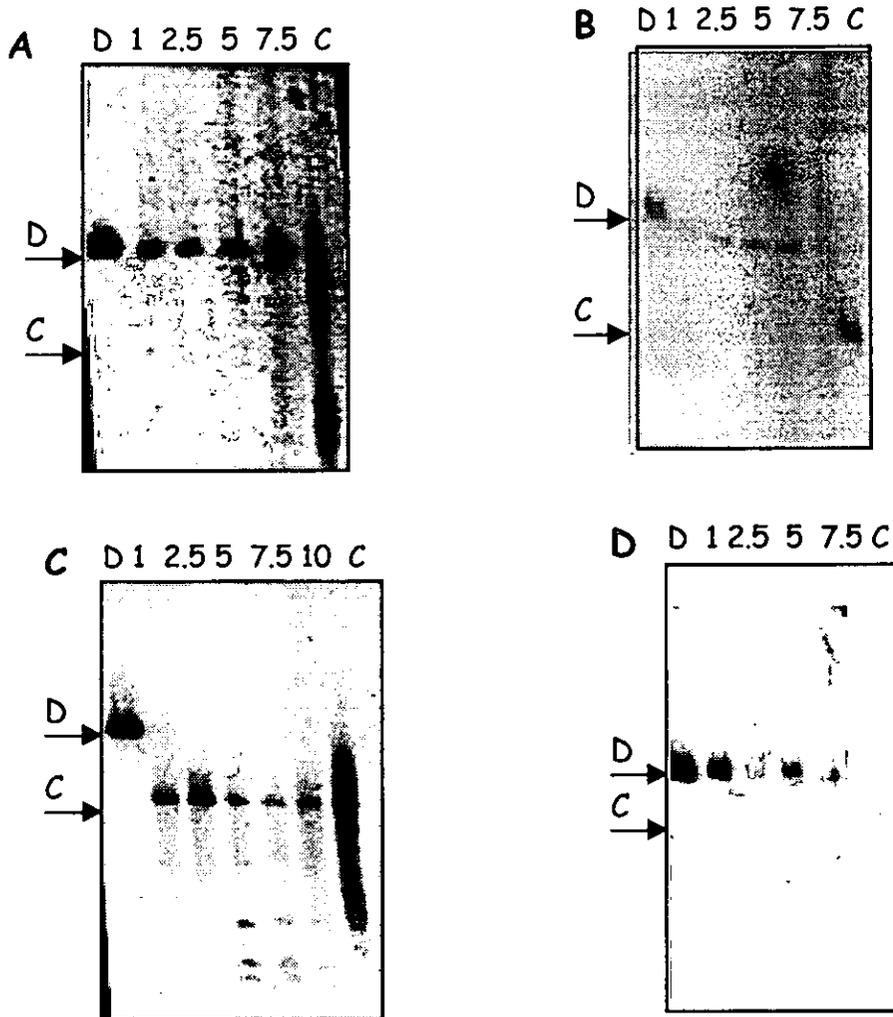


Fig.16. Análisis por geles de agarosa de las partículas de doble capa (DLPs) reconstituidas con las proteínas recombinantes. Para todos los casos la posición de las muestras es la misma. En el primer carril las DLPs silvestres (2 μ g), después las partículas reconstituidas con cantidades crecientes de proteína (1 a 10 μ g), y en el último carril cores virales (2 μ g). La D indica la migración de las DLPs y La C la de los cores. En A) con VP6/wtA, B) con VP6/44-61, C) con VP6/P309D y D) con VP6/wtC.

En la figura 17A se muestra que la actividad de las partículas reconstituidas con VP6/wtA es alrededor del 60% de la que presentan las DLPs silvestres. Por otro lado, las partículas reconstituidas con VP6/44-61 también mostraron ser activas en transcripción, con valores alrededor del 40% con respecto a las DLPs silvestres (Fig. 17C). En ninguno de estos dos casos se observa un diferencial en la actividad de transcripción en función del aumento de la cantidad de proteína añadida al ensayo de reconstitución, de acuerdo a lo observado en los geles de TGA, donde desde la menor cantidad de proteína añadida se observaba un cambio de migración total de los cores a las DLPs.

Lo que observamos en la figura 17D es que para las partículas reconstituidas con VP6/P309D, la actividad de transcripción es menor del 10%, lo cual está también de acuerdo a lo observado en los geles de TGA, donde no se observó ensamble de esta proteína para generar DLPs.

Para las partículas reconstituidas con VP6wtC, a pesar de que si hubo formación de DLPs, estas partículas presentan una actividad de transcripción de aproximadamente 10% en relación a las DLPs silvestres (Fig. 17B), lo cual indica que no es suficiente que la proteína VP6 esté ensamblada, sino que debe tener los contactos correctos con VP2 para activar la transcripción de las partículas.

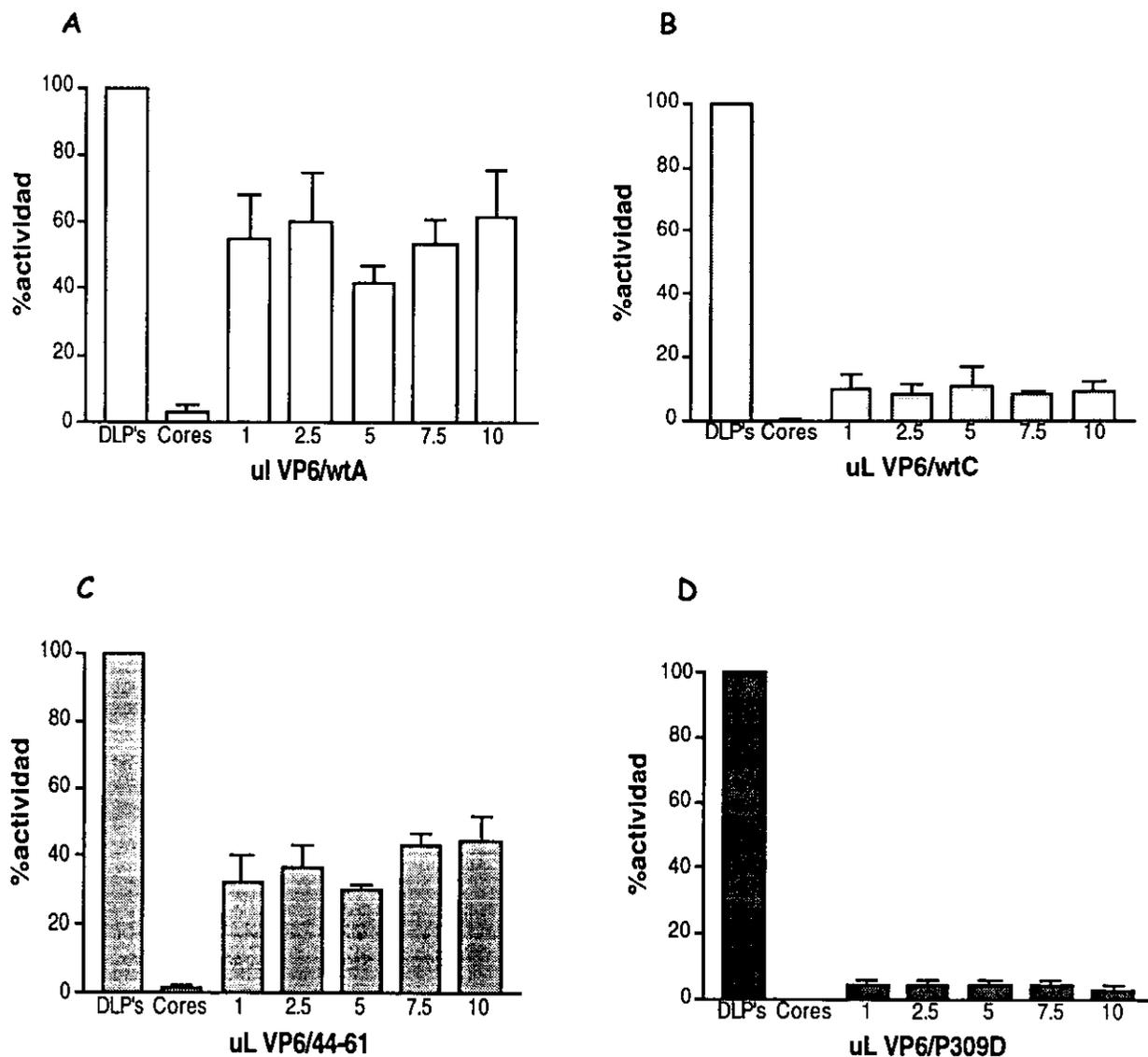


Fig.17. Actividad transcripcional de las partículas reconstituidas con las cuatro diferentes proteínas recombinantes. El porcentaje es la actividad de transcripción a tiempo 60' (medida por incorporación de ^3H -UTP), menos la actividad que mostraron las muestras a t 0', referido al 100% de actividad obtenida de las DLP's silvestres. Se muestra el promedio de cuatro experimentos, cada uno por duplicado y la desviación estándar.

DISCUSION

Las cuatro proteínas VP6 recombinantes obtenidas por expresión en el sistema de baculovirus, no se sintetizaron de manera muy abundante y sólo se pudieron purificar parcialmente (Fig. 10). Pese a la presencia de otras proteínas celulares en las fracciones enriquecidas para VP6, se logró determinar la identidad de las cuatro proteínas sintetizadas (VP6/wtA, VP6/44-61, VP6/P309D y VP6/wtC), utilizando distintos ensayos. Aunque por *Western blot*, con el anticuerpo policlonal (α YM) dirigido contra rotavirus, sólo se tuvo señal con la proteína silvestre VP6/wtA, por inmunotinción de las células de insecto, utilizando el mismo anticuerpo, sí se pudo detectar la expresión de las proteínas (wtA, 44-61 y P309D). También por ensayos de *dot blot*, utilizando un anticuerpo monoclonal contra VP6 (255), se observó reacción con la proteína recombinante VP6/wtA, así como con las proteínas mutantes 44-61 y P309D. Por ninguno de los métodos de detección inmunológica, se detectó la proteína VP6 del grupo C, de acuerdo a lo esperado, ya que se sabe que esta proteína no cruza antigénicamente con la VP6 del grupo A. Por migración en gel de poliacrilamida el peso molecular observado para cada una de las proteínas recombinantes fue el esperado. Finalmente, al extraer el DNA de los cuatro baculovirus recombinantes y caracterizar el patrón de restricción del gen de VP6 amplificado por PCR de estos DNAs, se confirmó la identidad de cada uno de los cuatro baculovirus recombinantes.

La proteína VP6 es la proteína más abundante del virión, y también el mejor inmunógeno. Sin embargo, para interactuar con la proteína, los anticuerpos inducidos por VP6, aún los policlonales, para reaccionar dependen en gran medida, de que la proteína mantenga su estructura tridimensional, y en

algunos casos su estructura trimérica. Esto explica por ejemplo, la baja reactividad de la proteína VP6/wtA en el ensayo de *Western blot* y la ausencia o muy baja reactividad (por debajo del límite de detección) de las proteínas VP6/44-61 y VP6/P309D. En los ensayos de inmunotinción en las células de insecto se observó una señal clara con el anticuerpo policlonal para las tres proteínas del grupo A, probablemente debido a que la conformación de las proteínas se encuentra en un estado mas favorable para el reconocimiento por el anticuerpo. De igual manera, en los enayos de *dot blot* la proteína en solución se fija directamente a la membrana, sin desnaturalizarla previamente, lo que contribuye a mantener una estructura cercana a la nativa.

Con las cuatro proteínas se hicieron los ensayos de ensamble sobre cores virales para obtener DLPs y así poder medir la actividad de transcripción de cada una de ellas, lo que permitiría determinar el efecto de las mutaciones que se hicieron en la proteína VP6, sobre la actividad de transcripción del virus.

Todas las proteínas, a excepción de la mutante P309D, se ensamblaron sobre los cores virales, formando partículas de doble capa. En todos los casos se probaron diferentes cantidades de cada una de las proteínas (de 1 a 10 μg). A partir del análisis de las partículas formadas, usando el sistema de geles de agarosa, se observó que desde la cantidad más pequeña de proteína utilizada (1 μg), se obtenía el 100% de DLPs. Esto muy probablemente se debe a que el reactivo limitante es la cantidad de cores (2 μg) que se tiene en el ensayo, por lo que desde la primera cantidad que se prueba de proteína es suficiente para que se utilicen todos los cores presentes, sin que la proteína excedente participe en el ensamblaje de las partículas de doble capa.

Los ensayos de transcripción *in vitro* de las DLPs reconstituidas con las proteínas recombinantes mostraron que la proteína VP6/wtA reconstituyó aproximadamente el 60% (Fig. 16A) de la actividad que tuvieron las DLPs silvestres, lo cual indica que el proceso de ensamble *in vitro* no es

enteramente eficiente, o que las proteínas se ensamblan de manera similar, pero no idéntica, al ensamblaje de las partículas virales en una infección del virus en células epiteliales.

De manera similar a como se ha reportado, la proteína VP6/wtC fue capaz de ensamblarse a los cores de virus del grupo A, y formar partículas de doble capa que pareciera que no tienen ninguna diferencia con las que se forman con la VP6/wtA, al menos en la migración en los geles de agarosa y al microscopio electrónico [29]. Sin embargo, cuando se hicieron los ensayos de transcripción *in vitro*, estas partículas presentaron una actividad de transcripción reducida, de aproximadamente el 10% de la actividad de las DLPs silvestres (Fig. 16B). Esto indica que aunque las proteínas de ambos grupos tengan una identidad del 40% y se formen partículas con doble capa, esto no es suficiente para que se active la transcripción viral. Probablemente los contactos entre VP2 y VP6 tienen que ser específicos en los rotavirus de los grupos A y C, para que la partícula tenga la conformación activa en transcripción.

Encontramos que la proteína mutante VP6P309D, a la que se le cambió una prolina por un ácido aspártico en la posición 309, no tiene la capacidad de formar trímeros (Fig. 12), o cuando menos estos son mucho menos estables que los formados por la proteína silvestre y se disocian cuando se calienta la proteína a 37°C. En los ensayos de reconstitución de partículas se vio que esta proteína no es capaz de ensamblarse en los cores virales y así formar la capa intermedia del virus. Estos resultados sugieren fuertemente que para que VP6 se ensamble en la partícula viral tiene que hacerlo en forma de trímeros. También se ha visto que otras mutaciones en las posiciones 251 y 256, en donde también se cambia la prolina por ácido aspártico, se pierde la formación de los trímeros [17, 26]. Estos residuos (251 y 256) se encuentran en el dominio superior de la proteína, en las estructuras D' y D'', mientras que el residuo 309 se encuentra en la hélice αA (Fig. 4). Aunque en la secuencia

líneal de aminoácidos estos residuos no están cerca, en la estructura tridimensional de la proteína sí lo están y es posible que cada monómero contribuya con su prolina en las posiciones 251, 256 y 309 para estabilizar al trímero [19]. Los aminoácidos de VP6 que interaccionan con VP2 en los cores, se encuentran en la base del trímero [19]. Probablemente la conformación trímerica de la proteína confiera una conformación correcta de la base de los trímeros de VP6 para que interactúen de manera estable con los cores.

Dado que es necesario que VP6 esté ensamblada en las partículas virales (en forma de DLPs) para que estas tengan actividad transcripcional, y que se ha visto que el RNA mensajero sale por los canales tipo I formados en VP6 [22], se hipotetizó que el potencial negativo que tiene estos canales, era importante para facilitar la extensión y síntesis de los RNA mensajeros. El potencial negativo que tienen estos canales está dado en gran parte por el asa $\beta 1$ - $\beta 2$ en VP6 [22], que se proyecta hacia el interior de los canales. Considerando esta información, decidimos evaluar la función de esta asa en la transcripción *in vitro*, por lo que en un trabajo anterior [C. Arias, resultados sin publicar] se hicieron mutaciones puntuales sobre residuos del asa $\beta 1$ - $\beta 2$, que provocaban un cambio en el potencial del canal. Estas mutaciones no afectaron la actividad de transcripción de la partícula. Debido a esto, en el presente trabajo evaluamos el posible papel del asa $\beta 1$ - $\beta 2$ en la transcripción viral, a través de remover el asa completa de la proteína VP6. Para esto se construyó la proteína VP644-61, a la cual le falta la región que va del residuo 44 al 61.

Los ensayos mostraron que la proteína VP6 con la remoción de la región comprendida entre los residuos 44 al 61 sí se puede ensamblar en los cores virales y formar partículas de doble capa. Estas partículas fueron transcripcionalmente activas, mostrando una actividad de aproximadamente el 40% de las DLPs silvestres, lo cual fué sólo 20% menor a la que se obtiene

con las DLPs reconstituidas con la proteína VP6/wtA (Fig. 16C). Estos resultados indican que el asa $\beta 1$ - $\beta 2$ de VP6 no es relevante para la transcripción viral.

Ya que el asa $\beta 1$ - $\beta 2$ se encuentra presente en los tres tipos de canales que tiene la partícula, podría tener alguna otra función. Se sabe, por ejemplo, que esta asa interacciona con la proteína VP4, ya que esta última proteína se encuentra insertada en los canales tipo II [22]. Es posible que la interacción del asa $\beta 1$ - $\beta 2$ con la proteína VP4 estabilice a las espículas de VP4 insertadas en la partícula madura, y que esta sea la razón por la cual la secuencia del asa esté conservada entre diferentes cepas de rotavirus [3, 23].

CONCLUSIONES

1. El asa $\beta 1-\beta 2$ que se proyecta hacia el interior de los tres tipos de canales presentes en la capa de proteína formada por VP6, no participa en la activación de la transcripción, ni es la responsable de la translocación de los RNAs mensajeros.

2. Se requiere que VP6 forme trímeros para poder ensamblarse en la partícula viral y así poder activar la transcripción del virus.

3. La proteína VP6 de grupo C, aunque puede ensamblarse en los cores virales de grupo A y formar partículas de doble capa, no genera partículas activas en transcripción, por lo que los contactos que establece con VP2 probablemente no son los adecuados para activar la transcripción de la partícula viral.

BIBLIOGRAFIA

1. Affranchino, J. L., and S. Gonzalez 1997. Deletion mapping of functional domains in the rotavirus capsid protein VP6 J. Gen. Virol. 78:1949-1952.
2. Almanza, L., C. F. Arias, and S. Lopez 1994. Amino acid sequence of the porcine rotavirus YM VP1 protein Res Virol. 145:313-7.
3. Anthony, I. D., S. Bullivant, S. Dayal, A. R. Bellamy, and J. A. Berriman 1991. Rotavirus spike structure and polypeptide composition J Virol. 65:4334-40.
4. Blacklow, N. R., and H. B. Greenberg 1991. Viral gastroenteritis N Engl J Med. 325:252-64.
5. Both, G. W., A. R. Bellamy, and D. B. Mitchell 1994. Rotavirus protein structure and function. Curr Top Microbiol Immunol. 185:67-105.
6. Chen, D., and R. F. Ramig 1993. Rescue of infectivity by sequential in vitro transcapsidation of rotavirus core particles with inner capsid and outer capsid proteins Virology. 194:743-51.
7. Chen, D., and R. F. Ramig 1993. Rescue of infectivity by in vitro transcapsidation of rotavirus single-shelled particles Virology. 192:422-9.
8. Clapp, L. L., and J. T. Patton 1991. Rotavirus morphogenesis: domains in the major inner capsid protein essential for binding to single-shelled particles and for trimerization Virology. 180:697-708.

ESTA TESIS NO SALI
DE LA BIBLIOTECA

9. Cornaglia, E., Y. Elazhary, and B. Talbot 1991. Characterization of bovine rotavirus VP6 and VP7 as glycoproteins using monoclonal antibodies *Fems Microbiol Lett.* 63:147-51.
10. Estes, M. K. 1996. Rotaviruses and their replication, p. 1625-1655. In B. N. Fields, D. N. Knipe, P. M. Howley, R. M. Chanock, J. L. Melnick, T. P. Monath, B. Roizman, and S. E. Straus (eds), *Virology*, vol. 2. Raven Press, New York.
11. Kohli, E., P. Pothier, G. Tosser, J. Cohen, A. M. Sandino, and E. Spencer 1993. In vitro reconstitution of rotavirus transcriptional activity using viral cores and recombinant baculovirus expressed VP6 *Arch Virol.* 133:451-8.
12. Kohli, E., P. Pothier, G. Tosser, J. Cohen, A. M. Sandino, and E. Spencer 1994. Inhibition of in vitro reconstitution of rotavirus transcriptionally active particles by anti-VP6 monoclonal antibodies *Arch Virol.* 135:193-200.
13. Labbé, M., A. Chplienne, S. Crawford, M. K. Estes, and J. Cohen 1991. Expression of rotavirus VP2 produces empty corelike particles *J. Virol.* 65:2946-2952.
14. Lawton, J., M. Estes, and B. Prasad 1999. Comparative structural analysis of transcriptionally competent and incompetent rotavirus-antibody complexes *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:5428-5433.
15. Lawton, J. A., C. Q. Zeng, S. K. Mukherjee, J. Cohen, M. K. Estes, and B. V. V. Prasad 1997. Three-dimensional structural analysis of recombinant rotavirus-like particles with intact and amino-terminal-deleted VP2: implications for architecture of the VP2 capsid layer *J. Virol.* 71:7353-7360.

16. Lepault, J., I. Petitpas, I. Erk, J. Navaza, D. Bigot, M. Dona, P. Vachette, J. Cohen, and F. Rey 2001. Structural polymorphism of the major capsid protein of rotavirus The EMBO Journal. 20:1498-1507.
17. Lopez, S., R. Espinosa, H. B. Greenberg, and C. F. Arias 1994. Mapping the subgroup epitopes of rotavirus protein VP6 Virology. 204:153-62.
18. Mansell, E. A. a. P., J. T. 1990. Rotavirus RNA replication: VP2, but not VP6, is necessary for viral replicase activity. J. Virol. 64:4988-4996.
19. Mathieu, M., I. Petitpas, B. Prasad, E. Kohil, P. Pothier, J. Cohen, and F. Rey 2001. Atomic structure of the major capsid protein of rotavirus: implications for the architecture of the virion The EMBO Journal. 20:1485-1497.
20. Nakata, S., Petrie, B., Calomeni, E. and Estes, M. K. 1987. Electron microscopy procedure influences detection of rotavirus J. Clin. Microbiol. 25:1902-1906.
21. Petitpas, I., J. Lepault, P. Vachette, M. Mathieu, E. Kohil, P. Pierre, J. Cohen, and F. Rey 1998. Crystallization and Preliminary X-RAY Analysis of Rotavirus Protein VP6 J. Virol. 72:7615-7619.
22. Prasad, B. V., R. Rothnagel, C. Q. Zeng, J. Jakana, J. A. Lawton, W. Chiu, and M. K. Estes 1996. Visualization of ordered genomic RNA and localization of transcriptional complexes in rotavirus Nature. 382:471-3.
23. Prasad, B. V., G. J. Wang, J. P. Clerx, and W. Chiu 1988. Three-dimensional structure of rotavirus J Mol Biol. 199:269-75.

24. Prasad, B. V. and M. K. E. 2000. Electron criomicroscopy and computer image processing techniques: use in the structure/funtion studies of rotavirus, p. 9-31. In I. J. G. a. U. Desselberger (ed.), Rotavirus methods and protocols, vol. 34. Humana Press Inc., Totowa, N. J.
25. Ready, K. F. M., Buko, K. M. A., Whippey, P. W., Alford, W. P. and Bancroft, J. B. 1988. The structure of tubes of bovine rotavirus nucleocapsid protein (VP6) assembled in vitro *Virology* 167:50-55.
26. Shen, S., B. Bruke and U. Desselberger 1994. Rearragment of the VP6 gene of group A rotavirus in combination with point mutation affecting trimer stability *J. Virol.* 68:1682-1688.
27. Stacy, P. S., and J. T. Patton 1987. Synthesis of plus- and minus-strand RNA in rotavirus-infected cells *J Virol.* 61:3479-84.
28. Thouvenin, E., Schoehn, G., Rey, F., Petitpas, I., Mathieu, M., Vaney, M. C., Cohen, J., Kohil, E., Pothier, P. and Havant, E. 2001. Antibody Inhibition of the transcriptase activity of the rotavirus DLP: a structural view *J. Mol. Biol.* 307:161-172.
29. Tosser, G., M. Labbe, M. Bremont, and J. Cohen 1992. Expression of the major capsid protein VP6 of group C rotavirus and synthesis of chimeric single-shelled particles by using recombinant baculoviruses *J Virol.* 66:5825-31.
30. Yeager, M., J. A. Berriman, T. S. Baker, and A. R. Bellamy 1994. Three-dimensional structure of the rotavirus haemagglutinin VP4 by cryo-electron microscopy and difference map analysis *Embo J.* 13:1011-8.
31. Yeager, M., K. A. Dryden, N. H. Olson, H. B. Greenberg, and T. S. Baker 1990. Three-dimensional structure of rhesus rotavirus by cryoelectron microscopy and image reconstruction *J Cell Biol.* 110:2133-44.

32. Yeager, M., G. G. Hsu and R. Bellamy. 1997. Projection Structure of VP6, the Rotavirus inner capsid protein, and comparison with Bluetongue VP7. *J. Mol. Biol.* 272:362-368.

33. Zeng, C. Q., Wentz, M. J., Cohen, J., Estes, M. K. and Ramig, R. F. 1996. Characterization and replicase activity of double-layer and single-layer rotavirus like particles expressed from baculovirus. *J. Virol.* 70:2733-2744.