

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**

**UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS  
PROFESIONALES Y DE POSGRADO**

**COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES**

**1997**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



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.

03072

**Estudio sobre interacciones entre  
las proteínas no estructurales de  
rotavirus**

**TESIS QUE PRESENTA EL  
M. EN BIOTECNOLOGIA  
RAMON ANTONIO GONZALEZ GARCIA-CONDE**

**PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA**

1997

**El presente trabajo se realizó en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Carlos F. Arias Ortíz.**



# Indice


<b>Resumen</b>	<b>7</b>
<b>Antecedentes</b>	<b>8</b>
<b>Generalidades sobre rotavirus como agente infeccioso</b>	<b>10</b>
<b>Composición y estructura de la partícula viral</b>	
Estructura de la partícula	11
Genoma	16
<b>Ciclo de Replicación</b>	<b>20</b>
Adsorción y penetración	22
Transcripción del genoma	23
Síntesis de proteínas	24
Replicación y encapsidación del genoma	26
Formación de partículas de doble capa	29
Adquisición de la capa externa de proteínas	29
<b>Principales características de las proteínas no estructurales</b>	<b>32</b>
<b>Planteamiento del problema</b>	<b>41</b>
Estrategia	41
Sistema de dos-híbridos	42
<b>Resultados</b>	<b>44</b>
<b>Artículo aceptado en Archives of Virology.</b> <b>"<i>In vivo</i> interactions among rotavirus non-structural proteins".</b>	<b>45</b>
<b>Interacción entre proteínas no estructurales</b> <b>en la cepa HF7c</b>	<b>78</b>

<b>Reactividad específica de los anticuerpos dirigidos contra las proteínas no estructurales</b>	<b>79</b>
<b>Localización intracelular de proteínas estructurales y no estructurales de rotavirus</b>	<b>79</b>
<b>Distribución de VP2 y NSP2</b>	<b>81</b>
<b>Distribución de VP6 y NSP2</b>	<b>82</b>
<b>Distribución de VP6 y NSP5</b>	<b>82</b>
<b>Discusión</b>	<b>86</b>
<b>Referencias</b>	<b>91</b>

## **Study on the interactions among rotavirus non-structural proteins.**

### **Summary**

The rotavirus genome encodes six nonstructural (NS) proteins, five of which (NSP1, NSP2, NSP3, NSP5, and NSP6) have been suggested to be involved in a variety of events, such as genome replication, regulation of gene expression, and gene assortment. These NS proteins have been found to be associated with replication complexes that are precursors of the viral "core", however little information is available about the intermolecular interactions that may exist among them. Using the yeast two-hybrid system, which allows the detection of protein-protein interactions *in vivo*, all possible combinations among the rotavirus NS proteins were tested, and several interactions were observed. NSP1 interacted with the other four proteins tested; NSP3 associated with itself; and NSP5 was found to form homodimers and to interact with NSP6. Co-immunoprecipitation of proteins from rotavirus-infected cells, using hyperimmune sera monospecific for the NS proteins, showed the same interactions for NSP1 as those observed in yeast. Immunofluorescence co-localization analysis of virus-infected epithelial cells revealed that the intracellular distribution of proteins that were shown to interact in yeast had patterns of distribution that would allow such intermolecular interactions to occur. These findings should contribute to understand the role these proteins play in different aspects of the virus replication cycle.



M. en C. Ramón Antonio González García-Conde.

Cuernavaca, Mor. 9/12/97.



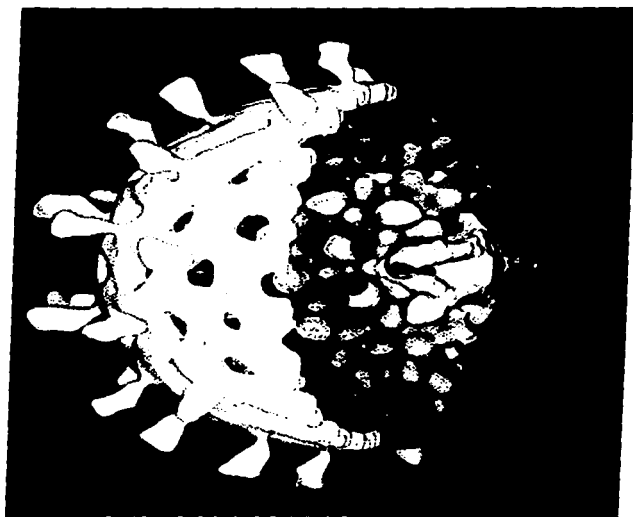
Dr. Carlos F. Arias Ortíz.



## **Resumen.**

**El genoma de los rotavirus codifica para seis proteínas no estructurales y se ha sugerido que cinco de ellas (NSP1, NSP2, NSP3, NSP5 y NSP6) están involucradas en una serie de eventos, como son la replicación del genoma, la regulación de la expresión génica y la distribución de los segmentos genómicos. Se sabe que estas proteínas no estructurales están asociadas a complejos moleculares que son precursores del "core" en la morfogénesis del virus; sin embargo, se desconoce cuales son las interacciones intermoleculares responsables de dicha asociación. Utilizando el sistema de dos-híbridos, el cual permite la detección de interacciones entre proteínas *in vivo*, se evaluaron todas las posibles interacciones entre las proteínas no estructurales. Se observó que NSP1 se asocia con las proteínas no estructurales NSP2, NSP3, NSP5 y NSP6; NSP3 forma homodímeros, al igual que NSP5, la cual interacciona además con NSP6. Mediante ensayos de coimmunoprecipitación de proteínas obtenidas de células infectadas con rotavirus, utilizando sueros monoespecíficos para cada una de las proteínas no estructurales, se obtuvieron las mismas interacciones con NSP1 que las que fueron detectadas en levadura. El análisis de la colocalización de estas proteínas en células epiteliales infectadas con el virus por medio de inmunofluorescencia, reveló que la distribución intracelular de las proteínas que interactúan en levadura, se localizan en la célula con patrones de distribución que permitirían que dichas interacciones ocurran. Estas observaciones deberán contribuir a entender el papel de las proteínas no estructurales en diferentes estadios del ciclo de replicación de los rotavirus.**

## **Antecedentes**



## **Generalidades sobre rotavirus como agente infeccioso.**

**A partir del descubrimiento de los rotavirus por Bishop y colaboradores en 1973 (Bishop *et al.*, 1973), se ha generado una gran cantidad de información sobre las propiedades biológicas y epidemiológicas de estos virus.**

**Los rotavirus han sido reconocidos como el agente etiológico más importante de las gastroenteritis virales severas en niños menores de tres años, en todo el mundo. Se estima que alrededor de 125 millones de casos de diarreas causadas por rotavirus en niños menores de cinco años se registran anualmente, produciendo un saldo aproximado de 870,000 muertes (Kapikian & Chanock, 1990).**

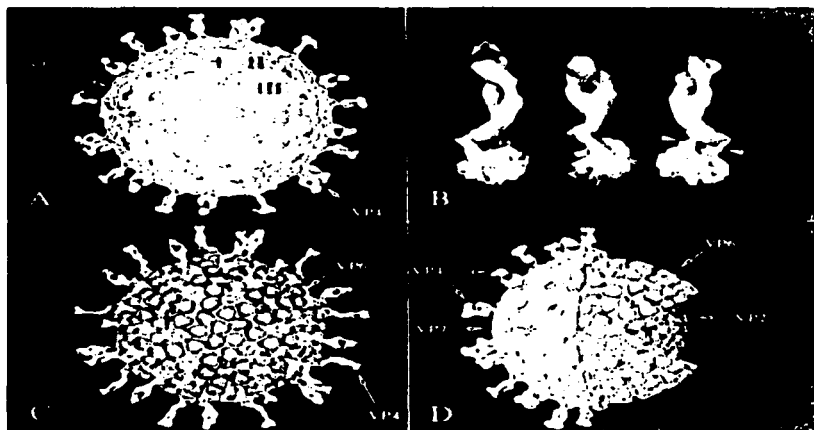
**El impacto epidemiológico de las infecciones por los rotavirus ha estimulado la investigación básica sobre aspectos de biología molecular y bioquímica del virus. La información obtenida a lo largo de veinticuatro años de estudio, ha permitido generar un panorama relativamente claro sobre la estructura de la partícula viral, así como la función que tienen las proteínas que la forman; sin embargo, no se dispone aún de una descripción detallada sobre su ciclo de replicación y el papel que desempeñan cada uno de los componentes virales.**

## **Composición y estructura de la partícula viral.**

### **\*Estructura de la partícula.**

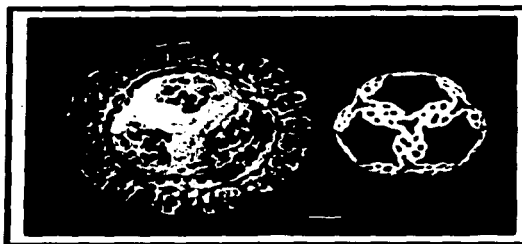
Los rotavirus son virus que no están envueltos por una membrana lipídica y están compuestos por tres capas concéntricas icosaédricas de proteínas. Estudios realizados utilizando criomicroscopía electrónica y reconstrucción de imágenes por computadora, han permitido realizar análisis detallados de las características estructurales del virión (Fig. 1). La partícula viral mide aproximadamente 1000 Å de diámetro y su estructura tiene una simetría  $T=13/1$ . La capa externa del virus está formada por 780 moléculas de la glicoproteína VP7. De ésta se proyectan 60 peplómeros o espículas de 120 Å de longitud, constituidos por dímeros de la hemaglutinina viral VP4; la base de los dímeros de VP4 interacciona con la capa intermedia de proteínas. Esta consta de 260 unidades morfológicas constituidas por trímeros de la proteína VP6; la capa intermedia envuelve a su vez a la nucleocápside o "core" (Prasad & Chiu, 1994). La capa protéica del "core" está constituida por 120 moléculas de VP2 y envuelve a otra entidad estructural que consta de las proteínas VP1, VP3 y once segmentos de RNA de doble cadena (RNAdc), los cuales parecen estar también organizados con una simetría icosaédrica (Prasad *et al.*, 1996). Prasad y colaboradores (1996) han observado que de los 18,525 pares de bases (pb) que constituyen al genoma viral (de la cepa de simio SA11), 4,500 pb están organizados con una simetría icosaédrica; este orden parece depender del ensamble icosaédrico de VP2 la cual, al hacer contacto con los segmentos de RNA, induce en éstos una organización icosaédrica (Fig.2). Por otra parte, estudios de sedimentación de segmentos aislados de RNAdc, mostraron que éstos se comportan de una manera consistente con un modelo que predice una estructura de cilindros flexibles con una longitud en solución acuosa de

aproximadamente 1125 Å y un diámetro de 30 Å (para el segmento 9). Considerando dicha longitud, los segmentos de RNAdc no podrían ser plegados para caber en una cápside con un diámetro interno de 50 nm (Desselberger & McCrae, 1994; Prasad *et al.*, 1988).



**Figura 1. A)** Representación tridimensional de la superficie de rotavirus. Se señalan con flechas las proteínas que forman la capa externa, VP4 y VP7. Los números romanos indican la posición de los tres tipos de canales acuosos. **B)** Una espícula aislada, formada por un dímero de VP4 y vista en varios ángulos. **C)** Representación tridimensional de la superficie de una partícula de doble capa, mostrando la interacción entre la base de los dímeros de VP4 y VP6. **D)** Corte en cada una de las tres capas de rotavirus; las flechas señalan las proteínas que componen cada una de las capas. (Shaw et al., 1996)

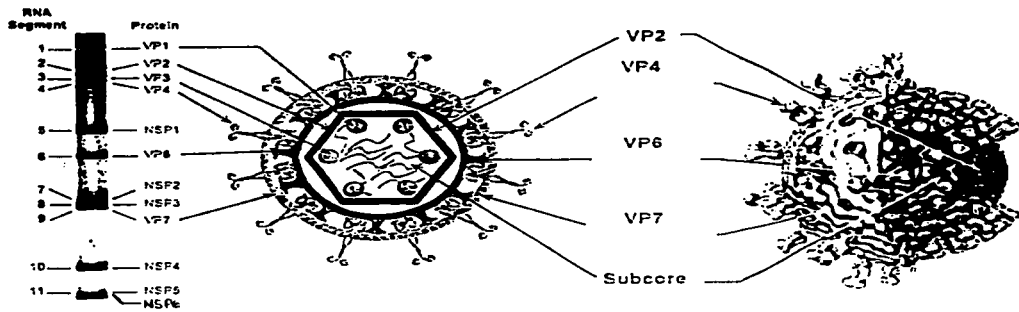
En conjunto, estas observaciones indican que las proteínas VP1, VP2 y VP3 deben de estar involucradas en la organización del genoma dentro del "core" a través de interacciones proteína-RNA (Prasad & Chiu, 1994).



**Figura 2.** Organización estructural del RNA dentro de rotavirus. a) Corte de la partícula de doble capa, mostrando la organización de VP6(azul), VP2 (verde) y el complejo VP1-VP3(rojo). b) Capa dodecahédrica mostrando la organización del RNA. Barra, 100 Å. (Lawton et al., 1997)

La partícula viral está perforada por 132 canales "acuosos", que han sido clasificados en tres grupos según sus características de simetría y dimensiones; estos canales están alineados desde la capa externa hasta el "core". Aunque el papel que desempeñan estos canales en el ciclo de replicación del virus no se conoce con detalle, se piensa que podrían estar involucrados en la entrada de metabolitos necesarios para la transcripción dentro de la partícula de doble capa, así como en la salida de los transcritos virales (Estes & Cohen, 1989; Prasad & Chiu, 1994). El análisis por criomicroscopía electrónica utilizando partículas de doble cápside en proceso activo de transcripción, muestra que los mRNAs virales salen de la partícula a través de canales "acuosos" tipo I, localizados en los vértices de la partícula, con simetría de cinco; estos estudios han mostrado también que las proteínas VP1 y VP3 se localizan cerca de los sitios en los que se alinean estos canales, en el interior de la cápside formada por VP2 (Lawton *et al.*, 1997).





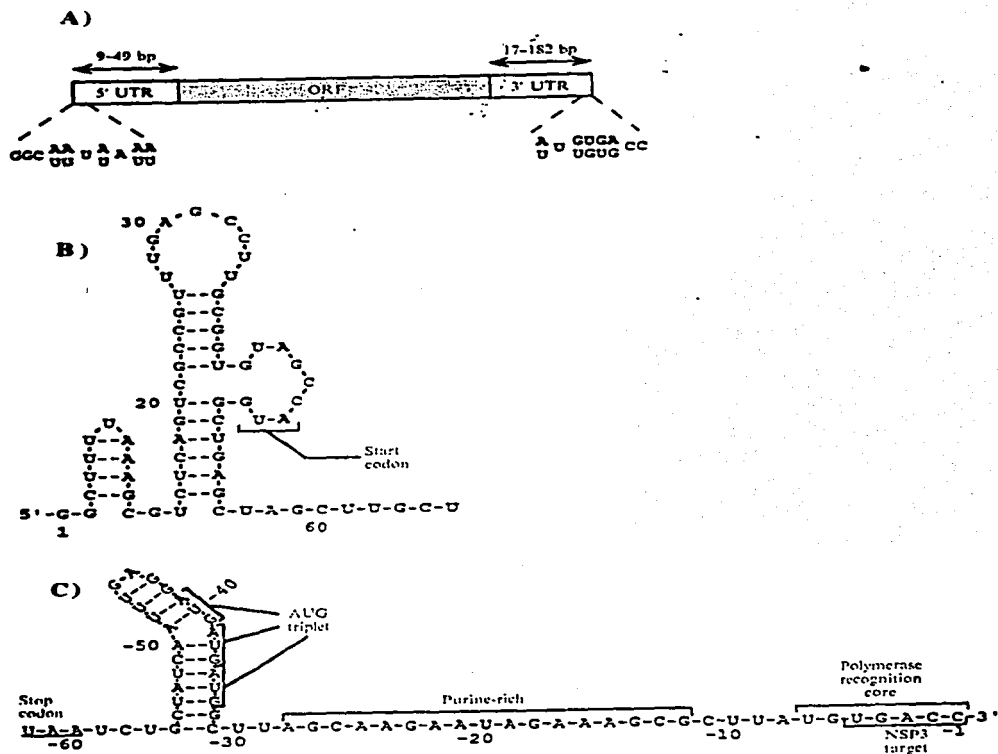
**Figura 3. Representación esquemática de la estructura tridimensional de rotavirus, la composición de la partícula y las proteínas codificadas por los segmentos de RNA. (Mattion et al., 1994)**

## \*Genoma

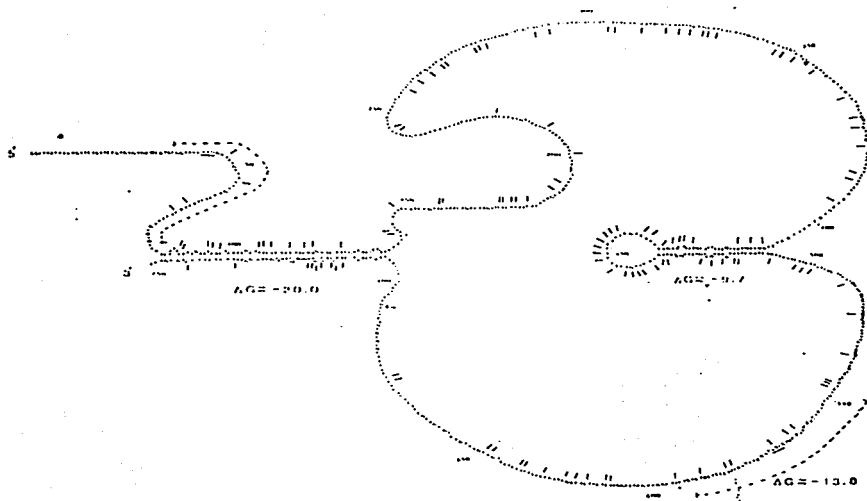
El genoma de los rotavirus consta de once segmentos de RNA de doble cadena, que para la cepa de simio SA11, van de 3302 pb (gene 1) a 667 pb (gene 11) (Both *et al.*, 1994; Mattion *et al.*, 1994). Cada segmento codifica para una proteína, excepto el gene 11, el cual contiene dos marcos de lectura abiertos que son funcionales, ya que son traducidos *in vitro* e *in vivo* (Estes & Cohen, 1989; Mattion *et al.*, 1991) (Fig. 3). La replicación del genoma se lleva a cabo de manera conservativa, siendo la hebra positiva del RNA recién sintetizada la que funciona como mRNA y como templado para la síntesis de la hebra complementaria (Patton, 1995).

Los genes del virus están flanqueados por secuencias no traducidas en los extremos 5' y 3'; la longitud de estas secuencias es variable entre los diferentes genes (entre 9 y 49 nucleótidos en el extremo 5' y entre 17 y 182 nucleótidos en el extremo 3'), pero se conserva entre los segmentos equivalentes de cepas aisladas de diferentes especies. Los primeros 10 nucleótidos en los extremos 5', así como los últimos 8 nucleótidos en los extremos 3', están altamente conservados entre todos los segmentos de las diferentes cepas; las secuencias consenso de estas regiones son: 5'(GGC<sup>A</sup><sub>U</sub><sup>A</sup><sub>U</sub>U<sup>A</sup><sub>U</sub>A<sup>A</sup><sub>U</sub><sup>A</sup><sub>U</sub>...)3' y 5'(...<sup>A</sup><sub>U</sub>U<sup>G</sup><sub>U</sub><sup>U</sup><sub>G</sub><sup>G</sup><sub>U</sub><sup>A</sup><sub>G</sub>CC)3' respectivamente (Estes & Cohen, 1989; Patton, 1995)(Fig.4A). La hebra positiva del RNA tiene una estructura de "Cap" (m<sup>7</sup>GpppG(m)GC...) en el extremo 5' y no tiene señal de poliadenilación (Imai *et al.*, 1983; McCrae & McCorquodale, 1983). A través de predicción de estructura secundaria, se ha encontrado que estas secuencias podrían formar estructuras tipo tallo y asa ("panhandle") (Fig. 4B); Okada y colaboradores (1984), reportaron que el segmento del gene 10 podría formar este tipo de estructuras secundarias mediante la interacción entre los

extremos 5' y 3' (Fig. 5). Xu y colaboradores han propuesto que la interacción entre los extremos 5' y 3' de los segmentos de RNA del virus de tumor inducido por herida, "wound tumor virus" (WTV), un virus perteneciente a la familia Reoviridae, al igual que los rotavirus, son importantes para la modulación de la expresión de los distintos segmentos del genoma, además de funcionar como señales para su distribución en el proceso de encapsidación (Xu *et al.*, 1989). En el caso de los rotavirus, se piensa que las regiones no traducidas de los segmentos pueden tener un papel similar al que ha sido propuesto para el WTV. Recientemente se ha reportado que en las regiones no traducidas de los mRNAs de los rotavirus, existen señales de replicación que actúan *cis*. Entre éstas, se ha definido una señal promotora mínima, esencial para la síntesis de la hebra negativa de RNA en la replicación, que está formada por los últimos siete nucleótidos del extremo 3' (Fig. 4C). Dos regiones adicionales, identificadas en los segmentos 8 y 9, funcionan como reguladores positivos ó "enhancers", ya que en presencia de éstas se obtiene un nivel óptimo de síntesis; estas secuencias consisten de aproximadamente 25 nucleótidos, inmediatamente "rfo arriba" de la región promotora en el extremo 3' y de al menos 10 nucleótidos en el extremo 5' del mRNA (Wentz *et al.*, 1996a; Wentz *et al.*, 1996b).



**Figura 4.** A) Representación esquemática de la organización de los genes de rotavirus; flanqueando al marco abierto de lectura (ORF), se muestran las regiones no traducidas 5' y 3' y las secuencias consenso de los extremos. B) y C) Predicción de la estructura secundaria de los extremos 5' y 3', respectivamente, del mRNA del gene 8 de rotavirus. En la región 3' se muestra la secuencia blanco para la polimerasa viral y la secuencia mínima de reconocimiento de la proteína NSP3. (Patton, 1995).



**Figura 5.** Predicción de la estructura secundaria del segmento correspondiente al *gene10* de rotavirus, mostrando la interacción potencial entre los extremos 5' y 3' que resultaría en una estructura tipo "panhandle". (Okada et al., 1984).

El genoma viral codifica para doce proteínas, entre éstas, seis son proteínas estructurales (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 y VP7), mientras que otras seis, son proteínas conocidas como no estructurales ya que no están presentes en la partícula viral madura (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 y NSP6) (Estes & Cohen, 1989).

Aunque todas las proteínas codificadas por el genoma viral han sido identificadas, el papel que desempeña cada una de ellas en el ciclo de replicación del virus ha sido sólo parcialmente descrito para las proteínas estructurales y para una de las proteínas no estructurales (NSP4) (Au *et al.*, 1989; Au *et al.*, 1993). Sin embargo, en años recientes el estudio y caracterización de las proteínas no estructurales ha mostrado que podrían ser importantes en los eventos iniciales de la encapsidación y replicación del genoma.

## **Ciclo de replicación**

Los rotavirus llevan a cabo su ciclo de replicación en el citoplasma de las células que infectan. La infección abate la síntesis de proteínas celulares resultando en una síntesis abundante de componentes virales, que se ensamblan en partículas de doble capa en el citoplasma; estas partículas geman subsecuentemente a través de la membrana de retículo endoplásmico (RE), en donde adquieren la capa externa de proteínas. La partícula viral madura es liberada mediante lisis celular (Fig. 6).

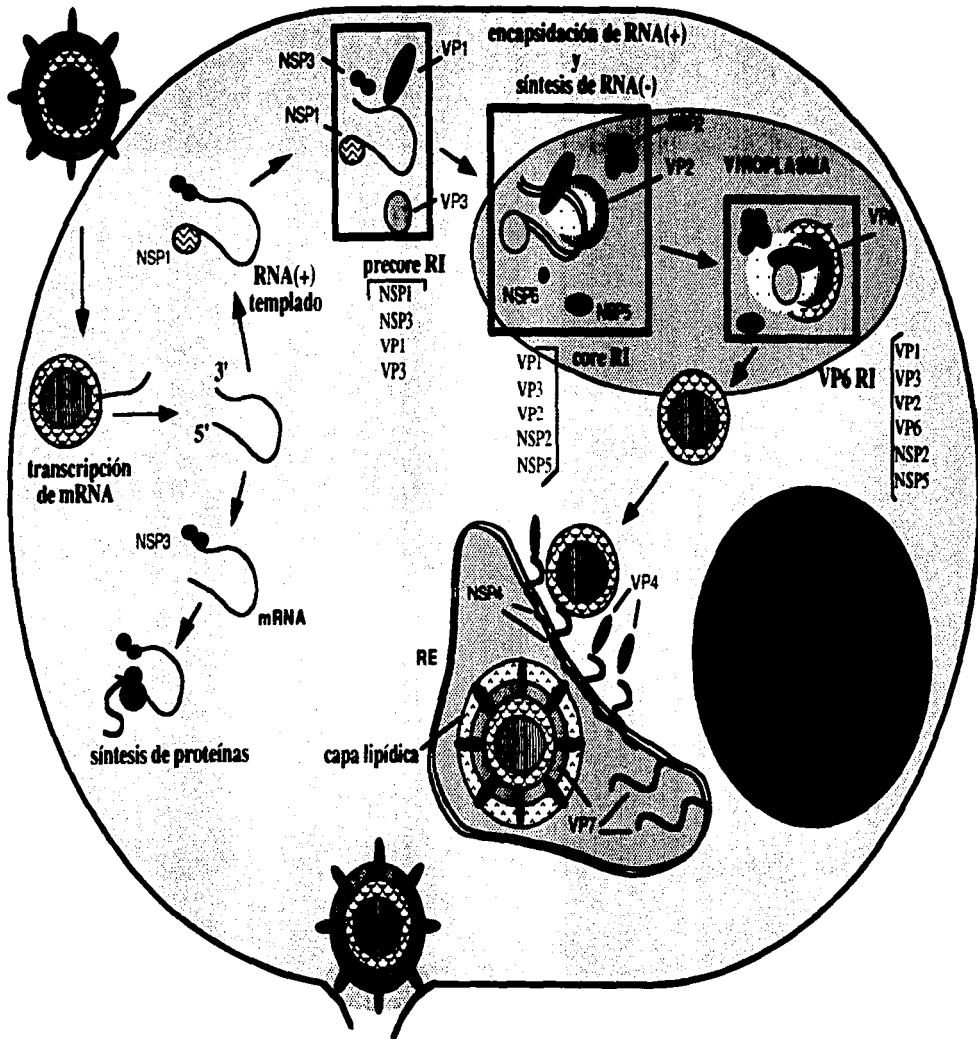


Figura 6. Representación esquemática del ciclo de replicación de rotavirus.

## **\*Adsorción y penetración**

El proceso inicial de la infección no se conoce con detalle; sin embargo, se sabe que las proteínas de cápside externa VP7 y VP4, son responsables de las primeras interacciones con la célula, así como de la penetración del virus. La infección por rotavirus se lleva a cabo mediante penetración directa de la membrana plasmática y depende de moléculas receptoras específicas. La identidad de la(s) molécula(s) receptora(s) no ha sido definida; sin embargo se sabe que los virus aislados de animales (no humanos), interactúan con ácido siálico y requieren de éste para la infección (Fukudome *et al.*, 1989; Keljo & Smith, 1988; Yolken *et al.*, 1987).

La proteína VP4 es responsable de la adsorción al ácido siálico en la superficie celular (Fiore *et al.*, 1991; Fukuhara *et al.*, 1988; Lizano *et al.*, 1991; Ludert *et al.*, 1996; Mackow *et al.*, 1989). Esta proteína es sensible a un corte proteolítico con tripsina en tres sitios que están completamente conservados en todas las VP4 secuenciadas; el corte genera las proteínas VP8 y VP5 y es responsable de un aumento en la penetración del virus a la célula (Arias *et al.*, 1996; Espejo *et al.*, 1981; Estes *et al.*, 1981). La proteína VP8 contiene el dominio responsable de la unión del virus a ácido siálico (Fuentes Panana *et al.*, 1995; Isa *et al.*, 1997), por lo que al menos en rotavirus animales es claro que la VP4 está directamente involucrada tanto en la adsorción como en la penetración del virus. Se desconoce si la VP7 desempeña algún papel en estos eventos; sin embargo, parece al menos ser importante en la conformación adoptada por VP4 (Mendez *et al.*, 1996).

Recientemente se reportó que tanto la proteína VP7 como la VP4 contienen secuencias conservadas de dominios de interacción con integrinas y se propone que estas secuencias pueden ser responsables de la unión del virus a la célula (Coulson *et al.*, 1997). Sin embargo, no se ha determinado si el virus interactúa directamente con integrinas y si éstas funcionan como receptores del virus.



Durante la penetración del virus a la célula, la partícula viral pierde la capa externa de proteínas. Aunque el mecanismo responsable de este evento se desconoce, se piensa que la remoción de la capa externa podría resultar en la activación de la transcriptasa viral (Cohen *et al.*, 1979; Suzuki *et al.*, 1986). Experimentos realizados *in vitro* han mostrado que el tratamiento de partículas completas con agentes quelantes de calcio, causan la pérdida de la capa externa de proteínas, activando así la transcriptasa en la partícula de doble capa (Sandino *et al.*, 1986).

### **\*Transcripción del Genoma**

Una vez que las partículas virales de doble capa se encuentran en el citoplasma de la célula, se lleva a cabo la transcripción de los genes virales. Se ha detectado síntesis de proteínas virales a partir de 70 min después de la infección, mostrando que la transcripción debe de llevarse a cabo muy poco tiempo después de la entrada del virus al citoplasma (Liu *et al.*, 1988). La transcripción de algunos genes del virus antecede al resto y se les ha considerado como genes tempranos (Johnson & McCrae, 1989); sin embargo, no existe una separación definida de fases de expresión de los genes de rotavirus (como es el caso de algunos virus de DNA). Existe controversia entre los reportes sobre la dinámica de expresión o replicación de los diferentes segmentos en función del tiempo en el ciclo de replicación (Johnson & McCrae, 1989; Patton, 1990; Stacy-Phipps & Patton, 1987). Johnson y McCrae, observaron que la transcripción de los genes 5, 6, 7 y 9, los cuales codifican para las proteínas NSP1, VP6, NSP2 y NSP3 respectivamente (en la cepa bovina UK), es independiente de síntesis de proteínas, llevando a los autores a postular que éstos puedan ser genes tempranos (Johnson & McCrae, 1989). Por otra parte, se ha observado que la transcripción de los diferentes segmentos no es homogénea, ya que los mRNAs no son sintetizados en cantidades equimolares, a pesar de que los segmentos de RNA de doble cadena se encuentran en cantidades equimolares en el virión. La cantidad de mRNA

sintetizado de algunos genes es hasta 4 veces mayor que otros (Johnson & McCrae, 1989; Patton, 1990; Stacy-Phipps & Patton, 1987). Asumiendo que la estabilidad de los mRNAs sea comparable, estos resultados sugieren que debe existir algún mecanismo regulatorio en la transcripción de los diferentes segmentos.

Como se mencionó, los transcritos virales cumplen tanto la función de mRNAs, como la de templados para la síntesis de la hebra negativa de RNA y se ha observado que pueden tener cualquiera de las dos funciones a lo largo del ciclo de replicación (Stacy-Phipps & Patton, 1987). Sin embargo, mientras que la síntesis de la hebra negativa de RNA ha sido detectada a partir de las 3 horas postinfección, alcanzando un máximo entre las 6 y 9 horas, el nivel máximo de síntesis de proteínas se alcanza entre las 3 y 5 horas (Ericson *et al.*, 1982; McCrae & Faulkner, 1981). Estas observaciones sugieren que una alta proporción de los mRNAs sintetizados después de las 5 horas postinfección debe ser secuestrada, de tal modo que no pueda servir en traducción y esté disponible para la replicación del genoma.

De cualquier manera, una vez sintetizados, los transcritos deben de funcionar para la síntesis de proteínas ó, dirigirse a sitios en los que se llevará a cabo la encapsidación y replicación del genoma.

### **\*Síntesis de Proteínas**

Si bien se sabe que la infección por rotavirus abate la síntesis de proteínas celulares desde tiempos tempranos después de la infección; se desconoce si existen mecanismos a través de los cuales la traducción de los mRNAs virales este favorecida en relación a los mRNAs celulares. Dado que la replicación de estos virus es completamente citoplásmica, la selectividad en la expresión de los genes virales sobre los celulares podría darse, al menos en parte, a nivel de la traducción de los mRNAs.

Entre los componentes virales que podrían considerarse como candidatos para funcionar en este proceso de selección, están las secuencias no traducidas de los extremos 5' y 3' de

los mRNAs y algunas de las proteínas no estructurales del virus que tienen la característica de interactuar con ácidos nucleicos (Patton, 1995). Dos de las proteínas no estructurales del virus, NSP1 y NSP3, se asocian de manera específica a los mRNAs virales y se ha propuesto que éstas se encuentren asociadas a componentes del citoesqueleto (Hua *et al.*, 1994; Hua & Patton, 1994; Mattion *et al.*, 1992; Poncet *et al.*, 1993). La localización de los mRNAs virales en sitios asociados al citoesqueleto puede promover la asociación de los polirribosomas con los mRNAs, favoreciendo la traducción de los mismos (Cervera *et al.*, 1981). Recientemente Poncet y colaboradores encontraron que la proteína NSP3, la cual se une a los extremos 3' de los mRNAs virales, interactúa con el factor de inicio de la traducción, eIF4G. El mapeo de la región responsable de la interacción con NSP3, mostró que la interacción ocurre a través de un dominio en la proteína que es codificada por una región del gene de eIF4G que había sido previamente considerada no codificadora (Piron & Poncet, 1997; Poncet *et al.*, 1997). Estos investigadores postulan que existe más de una forma de eIF4G en la célula y que la traducción de los mRNAs de rotavirus podría involucrar un mecanismo regulatorio no descrito. El factor de inicio de la traducción, eIF4G, es responsable de la interacción de los ribosomas con el "Cap" e interactúa con la proteína que une la región poli-A (poly-A binding protein) en el extremo 3' de los mRNAs celulares; por analogía, se postula que la interacción de NSP3 con eIF4G evitaría la asociación de este factor con la proteína que une poli-A, obstaculizando de esta manera la síntesis de proteínas celulares y favoreciendo la síntesis de proteínas virales. Una evidencia adicional que sugiere un mecanismo novedoso en la regulación de la traducción de los mRNAs de rotavirus ha sido recientemente reportada por Magnusson y colaboradores (1997), quienes encontraron que la infección por rotavirus resulta en la activación de la proteína cinasa activada por RNAdc (PKR). En algunos sistemas virales, la activación de esta enzima funciona como sistema de defensa celular y resulta en la hiperfosforilación de factores de traducción como eIF-2 $\alpha$  y eIF-4E y en la inhibición de la síntesis de proteínas; sin embargo estos investigadores reportan que en la infección por rotavirus, la activación de

**PKR no resulta en hiperfosforilación de estos factores (Fuentes *et al.*, 1997). Esto sugiere que la infección por rotavirus inhibe la función de PKR y dirige a los factores funcionales de inicio de la traducción hacia los mRNAs virales.**

**La síntesis de proteínas virales debe de estar sujeta además a algún mecanismo de regulación para los diferentes genes ya que las proteínas virales son sintetizadas a niveles distintos a los mRNAs que los codifican; algunas proteínas, como VP6, son sintetizadas a concentraciones que exceden en más de 100 veces la concentración de otras, como VP1; mientras que los mRNAs acumulados del gene 1 exceden alrededor de dos veces a los mRNAs del gene 6 (Johnson & McCrae, 1989).**

### **\*Replicación y Encapsidación del Genoma**

**Los procesos de encapsidación y replicación del genoma son eventos muy finamente coordinados ya que se llevan a cabo de manera concomitante. Los segmentos de RNA de doble cadena están siempre asociados a partículas (Patton, 1995; Patton & Gallegos, 1990).**

**Como se mencionó, Ramig y colaboradores (1997) han definido la secuencia mínima promotora para la síntesis de la hebra negativa de RNA *in vitro*; ésta consiste de 7 nucleótidos en el extremo 3' del mRNA (UGUGACC). Se han definido también secuencias necesarias para una síntesis óptima del RNA(-) en los extremos 5' y 3'; estas secuencias funcionan probablemente como reguladores positivos o "enhancers" de la replicación ya que, al ser eliminadas, se obtiene una síntesis deficiente de RNA(-) en un sistema de replicación *in vitro*. Estas secuencias comprenden los 26 nucleótidos "río arriba" del extremo 3', así como los nucleótidos 1 a 27 del extremo 5' (Patton, 1996; Wentz *et al.*, 1996b).**

La replicación de los segmentos inicia aparentemente con la asociación de la hebra positiva de RNA a complejos moleculares que incluyen a la polimerasa viral (VP1), la guanililtransferasa (VP3) y la proteína que forma la capa proteica del "core" (VP2). Entre estas proteínas, solo VP1 y VP2 son indispensables para la actividad de replicasa, ya que son suficientes para llevar a cabo la síntesis *in vitro* de la hebra negativa de RNA (Wentz *et al.*, 1996b). La VP1 tiene dominios que están presentes en las RNA polimerasas y se puede entrecruzar con azido-ATP al RNAdc presente en partículas de doble capa, sugiriendo que esta proteína es la replicasa viral. El hecho que VP2 sea necesaria para la actividad de replicasa, sugiere que funciona como base para el ensamblaje de la partícula y podría ser importante para que la VP1 adquiera una conformación activa.

En la célula infectada, además de las proteínas estructurales mencionadas, algunas proteínas no estructurales están asociadas a partículas subvirales capaces de llevar a cabo la replicación del RNA. Asimismo, algunas de las proteínas no estructurales están asociadas a complejos moleculares que son precursores de estas partículas; en conjunto, estas partículas subvirales precursoras de la nucleocápside han sido denominadas partículas Intermediarias de Replicación (RI) (Patton, 1995).

El inicio de la formación de las partículas RI es probablemente precedido por la asociación de las proteínas no estructurales NSP1 y NSP3 a los extremos 5' y 3', respectivamente, de los mRNAs virales. Patton y colaboradores (Gallegos & Patton, 1989; Patton & Gallegos, 1988) han observado que existen tres tipos diferentes de RI que pueden ser aisladas de acuerdo a su diferencia en tamaño. La composición de cada una parece obedecer una secuencia de eventos en los que algunas proteínas se adicionan y otras se sustraen de estos complejos a lo largo de la morfogénesis del virión (Fig. 7). El primer tipo de partícula en formarse (denominado "precore RI"), está constituido por los mRNAs virales, VP1, VP3 y parece mantener a las proteínas no estructurales NSP1 y NSP3

asociadas. La subsecuente pérdida de NSP1 y NSP3 y la adición de la proteína VP2 constituye la partícula "core RI", la cual tiene actividad de replicasa; a esta partícula están asociadas además las proteínas no estructurales NSP2 y NSP5 (Patton, 1995). La formación del "core RI" representa probablemente la etapa inicial de la replicación del genoma.

La encapsidación del genoma se lleva a cabo mediante la interacción de los segmentos de RNA(+) con las proteínas del "core". Una vez que el "core" se ha formado, los segmentos de RNA(+) son internalizados; se ha sugerido que la síntesis de la hebra negativa de RNA, podría llevarse a cabo en el mismo proceso de internalización del RNA. Esta idea se sustenta en la observación de Patton y Gallegos (1990), en la cual se muestra que las partículas con actividad de replicasa tienen una continua disminución en tamaño durante la replicación del RNA. Mientras que las partículas subvirales capaces de sintetizar RNA de doble cadena tienen un diámetro de aproximadamente 100 nm, las partículas en las que el genoma ha sido completamente replicado, tienen un diámetro de entre 45 y 75 nm. El tratamiento de las partículas con actividad de replicasa con RNAsas específicas de cadena sencilla produce partículas incapaces de sintetizar RNA y disminuye su diámetro de 100 nm a 45-75 nm. Por otra parte, las partículas en las que la replicación del genoma se ha completado no son sensibles a tratamiento con RNAsas de cadena doble o sencilla (Patton & Gallegos, 1990). Estas observaciones sugieren que los segmentos de RNA de cadena positiva se encuentran proyectados hacia fuera de las partículas precursoras del "core", antes de iniciarse la replicación. El hecho que estas partículas tengan un diámetro superior al del "core" podría explicarse por la presencia de los RNAs en el exterior de la partícula y por la asociación a éstos, de proteínas no estructurales.

## **\*Formación de partículas de doble capa**

La adición de trímeros de la proteína VP6 a los "core RI's" lleva a la formación de una partícula mayor denominada "VP6 RI"; esta partícula tiene actividad de replicasa y de transcriptasa (Gallegos & Patton, 1989). Las proteínas no estructurales asociadas, deben de perderse en algún evento posterior a la formación de las "VP6 RI" (Fig. 7).

La distribución intracelular de cada una de las proteínas involucradas en esta etapa de la morfogénesis del virus, sugiere que la formación de las partículas "core RI" y "VP6 RI", así como la replicación del genoma, debe de llevarse a cabo en inclusiones proteicas citoplásmicas denominadas viroplasmatas (Altenburg *et al.*, 1980; Kabcenell *et al.*, 1988; Petrie *et al.*, 1981). La formación de las partículas "precore RI" podría iniciarse en asociación con el citoesqueleto, antecediendo la formación de viroplasmatas.

Una vez que las partículas "VP6 RI" han sido formadas y que el genoma ha sido completamente replicado, estas partículas migran hacia el retículo endoplásmico donde el virus adquiere la capa externa de proteínas.

## **\*Adquisición de la capa externa de proteínas.**

Dos de las proteínas del virus son sintetizadas en asociación con el retículo endoplásmico rugoso (RER) y están glicosiladas: La proteína estructural VP7, la cual forma la capa externa del virus, es sintetizada en el RER y se mantiene asociada a la membrana, orientada hacia el lumen del RE (Ericson *et al.*, 1983; Kabcenell & Atkinson, 1985); la proteína no estructural NSP4 es también una proteína glicosilada residente del RER, la cual tiene al menos un dominio transmembranal, el cual permite que 132 residuos carboxilo terminales sean proyectados hacia el citoplasma. Este dominio citoplasmático funciona como receptor de las partículas con doble capa, interaccionando directamente con VP6; además NSP4

interacciona con la proteína VP4, la cual forma parte de la capa externa del virus. La interacción de NSP4 con VP6 y VP4 media la gemación de las partículas de doble capa hacia el interior del RE (Au *et al.*, 1989; Au *et al.*, 1993; Bergmann *et al.*, 1989; Both *et al.*, 1983; Chan *et al.*, 1988; Kabcenell & Atkinson, 1985). A través de este proceso las partículas adquieren una capa lipídica derivada de la membrana del RE. Por un proceso no bien entendido, estas partículas pierden la capa de lípidos, formándose la capa externa de la partícula constituida por VP7 y VP4. Las partículas maduras se liberan al medio mediante la lisis de la célula (Fig.6).



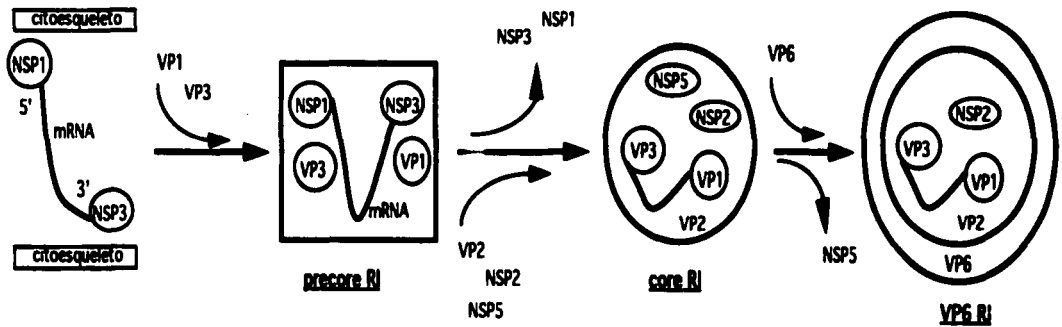
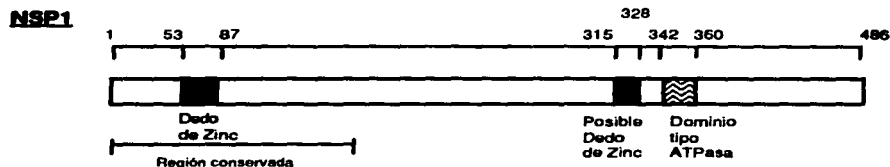


Figura 7. Formación de las partículas subvirales Intermediarias de la Replicación (RI)

## Principales características de las proteínas no estructurales

Como se mencionó, se ha observado que existen algunos estadios en los procesos de morfogénesis y de la replicación viral, en los que están presentes las proteínas no estructurales.



**Figura 8.** Representación esquemática de la proteína NSP1.

La proteína NSP1 es codificada por el gene 5, el cual consta de 1564 a 1611 nt, dependiendo de la cepa viral; la longitud de la proteína también es variable, de 486 a 495 aminoácidos (Patton, 1995). La secuencia del gene 5 es una de las menos conservadas de todos los genes de rotavirus; la similitud llega a ser tan baja como 34% al nivel de aminoácidos entre algunas cepas (Xu *et al.*, 1994). A pesar de la gran divergencia a nivel de la estructura primaria, la estructura secundaria predicha para las diferentes NSP1s es muy conservada (Xu *et al.*, 1994). A diferencia del resto de la proteína, la región amino terminal (150 aa) de la NSP1 es muy conservada y contiene una región rica en cisteínas e histidinas con una distribución típica de "dedo de zinc". Se ha demostrado que esta región une zinc y que es la responsable de la interacción de la NSP1 con el extremo 5' de los mRNAs virales (Brottier *et al.*, 1992; Hua *et al.*, 1994; Mitchell & Both, 1990).

Un motivo similar al “dedo de zinc” en el extremo amino de la proteína está también presente entre los residuos 315 y 328 de algunas cepas de rotavirus; sin embargo, se desconoce si este dominio está involucrado en la interacción con zinc o con ácidos nucleicos (Estes & Cohen, 1989). Mattion y colaboradores reportaron que una región de la proteína entre los aminoácidos 342 y 360 tiene similitud con ATPasas, pero se desconoce si este dominio tiene alguna función (Mattion *et al.*, 1994).

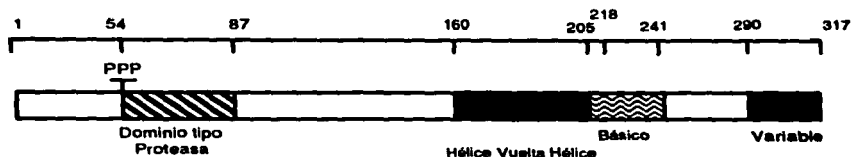
La NSP1 se sintetiza desde antes de las 3 horas después de la entrada del virus a la célula; la proteína se sintetiza en niveles bajos y se distribuye en todo el citoplasma. Su distribución y el hecho que la mayoría de la NSP1 copurifica con la fracción del citoesqueleto sugieren que probablemente está asociada a algún componente de éste (Hua & Patton, 1994).

Los estudios sobre la secuencia de los diferentes genes 5 reportadas muestran que este gene se segrega con especificidad de huésped, sugiriendo que NSP1 podría interactuar con proteínas celulares específicas de especie (Bremont *et al.*, 1987; Mitchell & Both, 1990; Xu *et al.*, 1994).

Esta proteína se encuentra asociada a las partículas “precure RI”, junto con VP1, VP3, NSP3 y los mRNAs virales (Patton, 1995). Mediante la interacción con el extremo 5' de los mRNAs virales, la NSP1 podría estar encargada de evitar la interacción de los ribosomas con los mRNAs y a través de su interacción con citoesqueleto, dirigirlos a sitios en donde los transcritos se ensamblan en partículas y son utilizados como plantillas para la síntesis de la hebra complementaria del RNA. En conjunto, las características conocidas de NSP1 sugieren que debe tener un papel importante en la replicación del virus. Paradójicamente, se han reportado variantes de rotavirus cuyo gene 5 ha sufrido modificaciones a través de rearrreglos genómicos y que son viables e infecciosas aún

cuando no sinteticen una NSP1 completa (Hua & Patton, 1994; Hundley *et al.*, 1985; Taniguchi *et al.*, 1996; Tian *et al.*, 1993). Algunas de estas mutantes viables sufrieron deleciones en el centro ó en el carboxilo terminal de la proteína. Taniguchi y colaboradores aislaron una mutante de bovino con una deleción de alrededor de 400 pares de bases en el gene 5; esta deleción resulta en una proteína que consiste en los 40 residuos amino terminales y excluye por lo tanto la región de "dedo de zinc" (Taniguchi *et al.*, 1996). Esto sugiere que con excepción de los 40 aa del amino terminal, la NSP1 es dispensable para la replicación del virus; esta variante produce sin embargo, placas más pequeñas que la cepa de la que se deriva por lo que la NSP1 debe de tener un papel importante en la eficiencia de replicación del virus. Sería interesante determinar si estas variantes están limitadas a nivel de traducción, replicación o encapsidación del genoma.

## NSP2

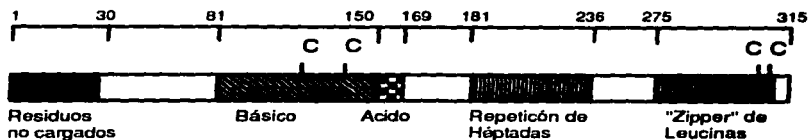


**Figura 9.** Representación esquemática de la proteína NSP2.

La proteína NSP2, codificada por el gen 7, 8 ó 9 dependiendo de la cepa viral, es una de las proteínas del virus sintetizadas en mayor abundancia (Estes & Cohen, 1989). La NSP2 se asocia con RNA sin especificidad aparente (Kattoura *et al.*, 1992); forma homocomplejos multiméricos y su interacción con RNA depende de su oligomerización. La región responsable de la multimerización no ha sido definida. La secuencia de aminoácidos del 54 al 87 tiene similitud con proteasas y metaloproteasas bacterianas. Un motivo tipo hélice-vuelta-hélice ha sido predicho entre los residuos 160 y 218, pero no se le ha asociado ninguna función. Por otra parte, una región básica conservada de la proteína, entre los aa 205-241, ha sido propuesta como responsable de su interacción con RNA (Patton *et al.*, 1993). La NSP2 se acumula en viroplasma. Mutantes que mapean en el gen de NSP2 son deficientes en formación de viroplasma y en la replicación del genoma, ya que generan partículas que no contienen RNA, por lo que se piensa que esta proteína está involucrada en la formación del "core" y en la replicación del genoma (Gombold *et al.*, 1985; Ramig & Petrie, 1984). Entre las evidencias que sugieren un papel para NSP2 en la replicación, está su capacidad de asociación con la VP1 y aunque de manera inespecífica, su capacidad de unión a RNA (Kattoura *et al.*, 1994). La NSP2 se encuentra asociada a

**partículas RI y está asociada principalmente con los "core RI" y "VP6 RI" (Gallegos & Patton, 1989; Patton, 1995).**

## NSP3



**Figura 10.** Representación esquemática de la proteína NSP3.

La proteína NSP3, codificada por el segmento 7 ó 9 dependiendo de la cepa viral, es una proteína muy conservada, forma homodímeros y probablemente complejos multiméricos mayores a través de la interacción de dos regiones hidrofóbicas localizadas en su extremo carboxilo. Estas regiones están comprendidas entre los residuos 181 al 236 y 275 al 305 y ambas constan de repeticiones de héptadas de aminoácidos hidrofóbicos. La repetición de héptadas que va del 275 al 305, tiene una secuencia de "zipper" de leucinas; ambas regiones tienen secuencias típicas de estructuras tipo "coiled-coil" (Mattion *et al.*, 1992; Rao *et al.*, 1995). La NSP3 se sintetiza en cantidades relativamente abundantes y se localiza en todo el citoplasma, probablemente en asociación con algún componente del citoesqueleto (Mattion *et al.*, 1992). Una de las características importantes de esta proteína es su capacidad de interacción con los extremos 3' de los mRNAs virales. La región mínima de interacción del extremo 3' de los mRNAs con NSP3, corresponde a la secuencia GACC, que está presente en los últimos cuatro nucleótidos en el extremo 3' de todos los mRNAs de rotavirus. Esta secuencia coincide con parte de la secuencia promotora de la polimerasa (VP1) para la replicación del genoma (Fig.4C) (Poncet *et al.*, 1993; Poncet *et al.*, 1994).

**El papel de NSP3 en el ciclo de replicación se desconoce, aunque se ha observado que se encuentra asociada a los "precore R1" (Gallegos & Patton, 1989; Patton, 1995), por lo que pudiera estar involucrada en la segregación del genoma y en la formación de la nucleocápside. Como se mencionó, recientemente Poncet y colaboradores, utilizando el sistema de dos-híbridos, encontraron que la proteína NSP3 interacciona con el factor de inicio de la traducción, eIF4G (Poncet *et al.* 1997). Esta observación sugiere que la NSP3 podría estar involucrada en favorecer la traducción de los mRNAs virales.**





**Figura 11.** Representación esquemática de la proteína NSP5.

Entre las proteínas de rotavirus, NSP5 y NSP6 son las proteínas menos caracterizadas; éstas son codificadas por dos marcos de lectura abiertos alternativos contenidos en el gene 11 (Mattion *et al.*, 1991). La NSP5 es una proteína de 198 aminoácidos, con un alto contenido de serinas y treoninas; es una proteína fosforilada y se ha observado que existen diferentes especies de ésta con varios grados de fosforilación (Blackhall *et al.*, 1997; Welch *et al.*, 1989). La NSP5 es también O-glicosilada, mediante un mecanismo enzimático que adiciona residuos de N-acetilglucosamina en el citoplasma (Gonzalez & Burrone, 1991). Esta proteína se localiza en viroplasma y une poly U *in vitro*. La NSP5 se asocia a partículas RI, siendo especialmente abundante en los "core RI" (Mattion *et al.*, 1991; Patton, 1995). Recientemente, se reportó que NSP5 tiene actividad de cinasa y debido a la presencia de una región que tiene similitud con creatin-cinasas, se ha propuesto que pueda autofosforilarse (Blackhall *et al.*, 1997)

### **NSP6**

La proteína NSP6 es codificada por un marco de lectura abierto alternativo en el gene 11 que inicia en los nucleótidos 80 a 82. La NSP6 consta de 92 aminoácidos y es sintetizada *in vitro* e *in vivo*. La secuencia de NSP6 es muy conservada entre todas las cepas en las que el gene 11 ha sido secuenciado. Aunque la función de esta proteína se desconoce, por inmunofluorescencia se ha mostrado que se localiza en viroplasma (Mattion *et al.*, 1991).

**Tabla 1. Principales características de las proteínas no estructurales de rotavirus.**

<b>Proteína</b>	<b>Gene (cepa porcina YM)</b>	<b>Especificidad de unión con RNA</b>	<b>Localización intracelular</b>	<b>Propiedades</b>
<b>NSP1</b>	5	Extremo 5' de los mRNAs virales	Citoplásmica	Proteína con dedos de zinc, especificidad por RNA parecida a VP3.
<b>NSP2</b>	8	Unión no específica (unión con ssRNA)	Viroplasma	Forma multímeros, interacciona con VP1
<b>NSP3</b>	7	Extremo 3' de los mRNAs virales	Citoplásmica	Forma multímeros, especificidad por RNA parecida a VP1
<b>NSP4</b>	10	-----	RER	Gemación y maduración de partículas de doble capa en el RER.
<b>NSP5</b>	11	No caracterizada (unión con polyU)	Viroplasma	Fosfoproteína, O-glicosilada
<b>NSP6</b>	11	No caracterizada	Viroplasma	Marco abierto de lectura alternativo.

## **Planteamiento del Problema.**

A pesar de la información que se ha generado en los últimos años sobre las proteínas no estructurales de rotavirus, se desconoce cual es el papel de cada una de ellas en el ciclo de replicación del virus. Algunas de sus propiedades estructurales y funcionales, además de su distribución intracelular, sugieren que estas proteínas podrían estar involucradas en el transporte de los mRNAs virales a su sitio de replicación, así como en la distribución y encapsidación de los once segmentos de RNA. Algunas evidencias recientes sugieren además, que estas proteínas podrían estar involucradas en coordinar la replicación del genoma y en regular su expresión. Entre las evidencias más claras que sugieren dichas funciones para estas proteínas, está su presencia en asociación con las diferentes partículas intermediarias de replicación; no se ha descrito sin embargo, cuales son las interacciones responsables de dichas asociaciones.

## **Objetivo.**

El objetivo de este trabajo se centró en caracterizar las interacciones entre las proteínas no estructurales, como un enfoque inicial para entender mejor cuales pueden ser las funciones de estas proteínas en el ciclo de replicación del virus.

## **Estrategia.**

Para analizar la posible asociación entre las proteínas no estructurales, inicialmente se utilizó el sistema de dos-híbridos, evaluando todas las combinaciones posibles entre las proteínas no estructurales. Subsecuentemente, mediante ensayos de coimmunoprecipitación, se buscó evidencia de que las interacciones encontradas en levadura también ocurren en células epiteliales MA104 infectadas con rotavirus. Finalmente se analizó la distribución de las proteínas no estructurales del virus en células MA104, utilizando microscopía confocal y doble inmunofluorescencia.

### **\*Sistema de los dos-híbridos.**

En 1989 Fields y colaboradores desarrollaron un sistema que permite detectar interacciones de muy baja afinidad entre proteínas *in vivo* (Fields & Song, 1989).

El sistema de dos híbridos se basa en la naturaleza modular de los llamados activadores de la transcripción. Entre los activadores de la transcripción más estudiados está el de los genes involucrados en el metabolismo de galactosa en la levadura *S. cerevisiae*, GAL4 (Keegan *et al.*, 1986; Ma & Ptashne, 1987). Esta proteína, al igual que otros activadores, consiste de dos dominios funcionalmente separables. Uno de los dominios une de manera específica secuencias de DNA que se localizan "rfo arriba" del promotor; denominadas "secuencias activadoras de la transcripción" (Upstream Activating Sequence, UAS). El funcionamiento del activador depende de la interacción del dominio de unión a DNA con su secuencia específica, la cual localiza al dominio de activación cercano a la región promotora blanco; el dominio de activación interacciona con factores de transcripción, promoviendo la formación del complejo de preiniciación de la transcripción (Choy *et al.*, 1993). Al ser expresados como dominios independientes, éstos pierden la capacidad de activar la transcripción; sin embargo, el dominio de unión a DNA mantiene la capacidad de interaccionar de manera específica con las UAS y el dominio de activación necesita solo ser situado cercano a la región promotora para funcionar como activador (Fields & Song, 1989).

El estudio de la interacción entre dos proteínas de interés ( X y Y) se lleva a cabo mediante la construcción de proteínas de fusión en las que el dominio de unión de GAL4 se fusiona a una proteína X y el dominio de activación, a una proteína Y. La interacción entre las proteínas X y Y permite el reestablecimiento funcional de GAL4 ya que a través de la interacción del dominio de unión a DNA, el dominio de activación puede ser situado cercano a su sitio de acción (Fig. 12).

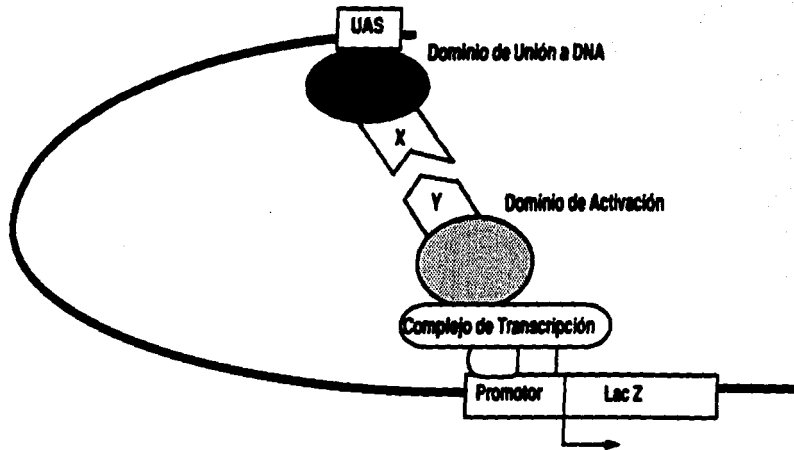


Figura 12. Representación esquemática del sistema de Dos-Híbridos.

## **Resultados**

Artículo aceptado en Archives of Virology.

***“In vivo interactions among rotavirus non-structural proteins”***

***In vivo* interactions among rotavirus nonstructural proteins**

**Ramón A. Gonzalez, Miguel A. Torres-Vega, Susana López, and Carlos F. Arias\***

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

**Running title: rotavirus nonstructural proteins**

**\* Corresponding author mailing address: Departamento de Genética y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 510-3, Colonia Miraval, Cuernavaca, Morelos 62250, Mexico. Phone: (52) (73) 29-1661. Fax: (52) (73) 17-2388. Electronic mail address: arias@ibt.unam.mx**



## **Summary**

**The rotavirus genome encodes six nonstructural (NS) proteins, five of which (NSP1, NSP2, NSP3, NSP5, and NSP6) have been suggested to be involved in a variety of events, such as genome replication, regulation of gene expression, and gene assortment. These NS proteins have been found to be associated with replication complexes that are precursors of the viral core, however little information is available about the intermolecular interactions that may exist among them. Using the yeast two-hybrid system, which allows the detection of protein-protein interactions *in vivo*, all possible combinations among the rotavirus NS proteins were tested, and several interactions were observed. NSP1 interacted with the other four proteins tested; NSP3 associated with itself; and NSP5 was found to form homodimers and to interact with NSP6. Co-immunoprecipitation of proteins from rotavirus-infected cells, using hyperimmune sera monospecific for the NS proteins, showed the same interactions for NSP1 as those observed in yeast. Immunofluorescence co-localization analysis of virus-infected epithelial cells revealed that the intracellular distribution of proteins that were seen to interact in yeast had patterns of distribution that would allow such intermolecular interactions to occur. These findings should contribute to the understanding of the role these proteins play in different aspects of the virus replication cycle.**

## **Introduction**

**Rotavirus, a member of the family *Reoviridae*, is the major aetiologic agent of severe gastroenteritis in infants and in the young of many animal species [24]. The rotavirus virion consists of three concentric icosahedral layers of proteins that surround a genome composed of eleven segments of dsRNA [43]. The outer-layer consists of 780 copies of the glycoprotein VP7, and 60 spikes formed by dimers of the viral hemagglutinin VP4 [42]. The intermediate layer is composed by trimers of VP6, which is necessary for viral transcriptase activity [7, 16, 46]. The viral core consists of the inner-most icosahedral layer formed by VP2, which encloses the putative RNA polymerase VP1[49], the guanylyltransferase VP3 [27, 50], and the dsRNA genome. The viral genome is replicated asymmetrically, with the mRNAs serving as templates for the synthesis of the complementary minus strand [8]. The synthesis of dsRNA is carried out in association with viral particles, as free dsRNA cannot be detected in infected cells; furthermore, the packaging and replication of the eleven segments of the viral genome must be a highly coordinated process, as the 11 dsRNA segments are present in equimolar concentrations in both infected cells and virions [36].**

**The viral genome also codes for 6 nonstructural proteins, which in the porcine rotavirus strain YM are encoded by genes 5 (NSP1), 7 (NSP3), 8 (NSP2), 10 (NSP4), and 11 (NSP5 and NSP6, encoded in two out-of-phase open reading frames [28]). Although all the rotavirus proteins have been characterized, the functions of the nonstructural (NS) proteins remain largely undefined -except for NSP4, which has been shown to be involved in the budding process and maturation of viral particles across the endoplasmic reticulum [2]. The NS proteins have been found to be associated with molecular complexes that are precursors of the viral core [14]. These replication intermediates (RI) may each have a distinct composition. The simplest of these subviral particles is the precore RI, which has no replication activity and consists of viral mRNAs, VP1, and VP3, and may have NSP1 and NSP3 associated. The core RI has been shown to**

possess replication activity and consists of mRNAs, VP1, VP2, and VP3, and may also include the NS proteins NSP2 and NSP5. The addition of VP6 to the core RI constitutes the VP6 RI, which possesses replication and transcription activity [14, 16, 35]. Finally, addition of the surface proteins VP4 and VP7 to the VP6 RI gives origin to the mature virus particles.

Although very little is known about the NS proteins, the fact that they are associated to the replication intermediates suggests that they participate in the early events of the replication cycle [34, 36]. Proteins NSP2, NSP5 and NSP6 have been shown to accumulate in viroplasmic inclusions, and NSP2 has been reported to bind RNA in a nonspecific fashion [38]; NSP2 forms multimers and has been found to associate with VP1 [25]. Temperature sensitive mutants with a lesion in the NSP2 gene have been shown to be defective in the formation of viroplasm with the accumulation of viral particles devoid of RNA [15, 44].

Proteins NSP1 and NSP3 are distributed throughout the cytoplasm, and may interact with components of the cytoskeleton [18, 20, 30]. These proteins have the ability to associate with specific sequences at the 5' and 3' end of viral mRNAs, respectively [18, 20, 39, 40]. Monomeric and multimeric NSP3 has been shown to interact with the 3' end four terminal nucleotides, which are conserved in all eleven rotavirus mRNAs; these nucleotides form part of the cis-acting signal that functions as the promoter for the synthesis of the minus-strand RNA during replication of the virus genome [30, 37, 39, 40]. On the other hand, although the sequence of the NSP1 gene is among the least conserved of the rotavirus genes (as low as about 40% at the amino acid level) [32], a region rich in cysteines near the amino terminus of the protein is highly conserved. This region conforms to a zinc-finger structure [19, 32, 33, 51] that is responsible for binding to zinc and to the 5' end of the viral mRNAs [18]. NSP1 is synthesized at very low levels and has been shown to be expressed at early times after infection; NSP3 is also expressed early in the replication cycle; however, it is synthesized in much larger quantities [10, 22].

To gain insight into the role the rotavirus NS proteins play in the virus replication cycle, we have investigated the interactions that exist among them by using the yeast two-hybrid system [12]. We found that in yeast cells several complexes can form. Some of these interactions were detected *in vitro* among proteins derived from virus-infected MA104 epithelial cells. Subcellular localization of the NS proteins in MA104 cells revealed that the proteins that were found to interact *in vivo*, either had a similar distribution or seemed to coincide in some of the locations they occupy. These results suggest that the series of interactions observed may be of relevance to the function of the NS proteins in the virus replication cycle.

## **Methods**

**Plasmid Constructions and expression of GST fusion proteins.** The full-length open reading frame of porcine rotavirus YM genes 5, 7, and 8 (unpublished data), encoding NSP1, NSP3, and NSP2, respectively; and a truncated open reading frame of gene 11 [28], encoding NSP5 with a 27 amino acid deletion at the amino terminus, were inserted into the multiple cloning site of plasmid pGEX-4T (Pharmacia, Biotech). These recombinant plasmids direct the synthesis of the rotavirus NS proteins fused to the carboxy terminus of glutathione-S-transferase (GST). For expression of the hybrid polypeptides, the plasmid-bearing *E. coli* cells were grown in LB medium to an  $OD_{600}$  of 0.6, and the cells were incubated with 1mM IPTG for 3 to 5 h, at 30°C. After this period of induction, the bacteria were lysed by mild sonication in phosphate-buffered saline (PBS) containing 20 µg/ml PMSF, and the lysate was brought to 1% Triton X-100 and incubated with gentle mixing for 30 min at room temperature. After this time, the lysate was centrifuged at 10,000 x g for 10 min at 4°C, and the proteins in pellets and supernatants were analyzed by SDS-PAGE and Coomassie-blue staining. The GST-fusion proteins were found mostly in the pellets and these fractions, containing mostly the protein of interest, were used to raise antibodies to NSP1, NSP2, NSP3 and NSP5 in rabbits and/or mice, using standard immunization protocols.

**Yeast two-hybrid assay.** The yeast two-hybrid system is based on the co-expression of two candidate proteins fused to the activation and DNA binding domains of the transcriptional activator GAL4. If the candidate proteins physically interact, they bring the GAL4 domains in sufficient proximity to activate GAL4 dependent transcription of a reporter gene.

The complete coding region of the rotavirus YM genes encoding proteins NSP1, NSP2, NSP3, NSP5, and NSP6 was each, independently inserted into the multiple

cloning site of plasmids pGAD424 and pGBT9 [3]. These vectors express the NS proteins fused to the carboxy terminus of the activation domain (GAD) and the DNA binding domain (GBD) of GAL4, respectively. The constructions were verified by nucleotide sequencing of the joining region.

The plasmid constructs containing TRP1 (pGBT9) and LEU2 (pGAD424) markers were co-transformed into competent SFY526 yeast cells by the lithium acetate method, as described by the manufacturer (Clontech Laboratories Inc.). Yeast strain SFY526 carries a *GAL1-lacZ* reporter gene, with upstream activating sequences and a promoter controlled by GAL4. Transformants were plated on yeast media lacking tryptophan and leucine, and were screened for  $\beta$ -galactosidase expression by colony lift filter assays [5], using X-Gal (Sigma Chemical Co.) as the chromogenic substrate. A liquid assay to quantitate the  $\beta$ -galactosidase activities was performed by growing the transformants to mid-logarithmic phase ( $O.D_{600nm} = 0.6$ ) in synthetic selective media (Clontech Laboratories Inc.) lacking tryptophan and leucine, and using ONPG (Sigma Chemical Co.) as the chromogenic substrate. Enzyme activities are expressed in units of  $\beta$ -galactosidase, where 1U of  $\beta$ -galactosidase is defined as the amount of enzyme which hydrolyzes 1  $\mu$ mole of ONPG to o-nitrophenol and D-galactose per minute [31]

**Protein labeling and immunoprecipitation assays.** Confluent MA104 kidney epithelial cells on 6-well plates were infected with porcine rotavirus YM at a multiplicity of infection of 5 ffu/cell. At 4.5 h postinfection the cells were incubated for 1.5 h with 30  $\mu$ Ci/ml of [<sup>35</sup>S]methionine (Dupont NEN, >1000 Ci/mmol) in methionine-free medium. After this labeling period, the cells were solubilized in lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 20  $\mu$ g/ml PMSF, 2  $\mu$ g/ml aprotinin, 2

**µg/ml leupeptin) for 5 min at room temperature. The cell debris were pelleted by centrifugation at 10,000 x g for 5 min at 4°C, and the supernatants were layered over a 30% sucrose cushion in PBS, and centrifuged at 280,000 x g for 45 min at 4°C. The soluble proteins that remained on the top of the sucrose cushion were recovered and stored at -20°C until use.**

**For immunoprecipitations, 5 µl of the hyperimmune serum were mixed with 20 µl of the pre-cleared [<sup>35</sup>S]methionine-labeled cell lysate, and 80 µl of radioimmunoprecipitation (RIPA) buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1% sodium deoxycholate, 1% Triton X-100, 0.1% SDS). After 30 min of incubation at room temperature, 25 µl of 50% Protein A-Sepharose beads in PBS was added, and the mixture was further incubated for 30 min at room temperature with gentle swirling. The Sepharose beads were washed twice with RIPA buffer containing 1 mg/ml BSA, and twice with RIPA buffer alone, and were then resuspended in 20 µl of loading buffer (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 2 mM EDTA, 10% glycerol, 1% β-mercaptoethanol, 1% SDS). These samples were boiled for 3 min, and the released proteins were analyzed by SDS-PAGE, and autoradiography.**

**Immunofluorescence.** MA104 cells grown on glass coverslips to approximately 80% confluence were infected with rotavirus YM at a multiplicity of infection of 1 ffu/cell. At 6 h post-infection, the cells were fixed with ice-cold 90% ethanol, washed twice with PBS, incubated with PBS-0.5% Triton X-100 for 5 min at room temperature, and washed twice with PBS with gentle swirling. The fixed cells were incubated overnight at 4°C with either individual anti-NS proteins sera or mixtures of rabbit and mouse anti-NS proteins sera for

double protein staining; the sera were used at 1:250 to 1:500 dilutions in PBS. After 4 washes with PBS, cells were incubated for 1 h at 4°C with goat anti-rabbit antibodies coupled to tetramethyl-rhodamine isothiocyanate (TRITC) (Sigma Chemical Co.) diluted 1/25 in PBS, and/or goat anti-mouse antibodies labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC) (Dako Co.) diluted 1/20 in PBS. Cells were washed 4 times and then were mounted on glass slides on 10% glycerol in PBS. The slides were analyzed by confocal microscopy using a Bio-Rad MRC-600 microscope and CoMOS MPL-1000 software. All confocal planes analyzed were 0.54  $\mu\text{m}$  thick; double staining was analyzed with 488-568 nm filters, and the same confocal planes for both rhodamine and fluorescein were imaged. As a negative control, mock-infected cells were stained and analyzed under identical conditions.



## Results

### *In vivo* interactions among rotavirus nonstructural proteins

Despite the fact that rotavirus NS proteins can be isolated as components of subviral replication complexes, apart from the well documented ability of proteins NSP2 and NSP3 to form homomultimers [25, 30, 39], little is known about the individual interactions that exist among them. To determine whether the rotavirus NS proteins are involved in the formation of other homo or heterocomplexes, we employed the yeast two-hybrid system, which has been shown to be a very sensitive method for detection of protein interactions *in vivo* [12]. For this purpose, full-length proteins NSP1, NSP2, NSP3, NSP5, and NSP6 from rotavirus YM were fused to the carboxy termini of the DNA binding domain (GBD) or the activation domain (GAD) of GAL4. After testing for interactions among all possible combinations of NS proteins, we found that NSP1 was able to associate with each of the other NS proteins; NSP3 associated with itself; and NSP5, in addition to forming homodimers, was also able to interact with NSP6. The strength of the interaction varied with different proteins, as judged by the time of appearance and intensity of the blue phenotype (Table 1). A liquid  $\beta$ -galactosidase assay was performed to provide a quantitative evaluation of the level of expression of *lacZ*, which has been suggested to reflect semi-quantitatively the stability of the interaction between the candidate proteins [11, 26, 52]. The values obtained for the positive interactions among the NS proteins are summarized in Table 1; only the protein combinations for which a positive signal for interactions was found are included. The interactions between NSP1 and the other NS proteins produced enzyme activities that were all within a comparable range: NSP1-NSP3 was the strongest recorded interaction, producing approximately 3.4 units of  $\beta$ -galactosidase, followed by NSP1-NSP6 and NSP1-NSP2, with approximately 2.4 and 2.1 units, respectively, while NSP1-NSP5 was the weakest one producing about 1.7 units. All these interactions were only observed when NSP1 was fused to GBD, suggesting that this protein may not be adequately folded when fused to the activation domain of GAL4. NSP1

fused to GBD had an intrinsic ability to activate transcription in the absence of a fusion counterpart in GAD; however, this activity resulted in lower enzyme levels (about 0.7 units) than those obtained when any of the NS proteins was fused to GAD. Furthermore, a similar background value was obtained for GBD-NSP1 when the rotavirus structural protein VP2, or a non virus related protein were used as fusion counterparts in GAD. Neither NSP1 nor any of the other NS proteins tested activated transcription at detectable levels when fused to GAD and assayed together with plasmid pGBT9 without insert. The interaction between the SV40 large T antigen (aa 84-708) and p53 (aa 72-390) was used as a positive control; this interaction produced approximately 20 units of enzyme activity. Although the enzyme activity obtained with the NSP1 interactions was much lower than that obtained with the positive control used, such differences in transcription activation are not uncommon; specific interactions among proteins have been identified by the two-hybrid system that produce enzyme activity values approximately 100 times lower than the activity produced by the control [17, 23, 45].

The known ability of NSP3 to form homodimers was also detected in this system; the interaction between NSP3-NSP3 was within the range of the NSP1 interactions observed, producing approximately 1.3 units of enzyme. As it was the case for GBD-NSP1, GBD-NSP3 also activated transcription at low levels in the absence of a fusion counterpart in GAD (Table 1). The ability of NSP1 and NSP3 to activate transcription cannot be explained; however, it has been observed that in many cases random polypeptides, or random protein domains, can cause transcription activation [29]. A two to four fold increment from background activity to the activity obtained with NSP1 or NSP3 interactions can be considered significant, as such increments in activity from background enzyme levels have often been associated with specific protein-protein interactions [9, 26, 45].

Evidence for the interaction between NSP5 molecules, and between NSP5 and NSP6 was also obtained. The NSP5-NSP5 and NSP5-NSP6 complexes produced enzyme

activities that were approximately 10 times lower than those obtained with the NSP1 interactions. Although these interactions produced lower enzyme levels, this activity was consistently reproduced and found to be clearly above background, as no activity could be detected when these proteins were tested against the GAD vector alone or against rotavirus VP2. The interaction between NSP5 and NSP6 was only obtained when NSP6 was fused to GAD, suggesting that in this case NSP6 may not acquire a proper folding when fused to GBD. No homocomplex formation was observed for NSP2; this finding was unexpected since there is biochemical evidence that indicates that NSP2 is able to multimerize [25]; however, as in the cases of GAD-NSP1 and GBD-NSP6, the GBD-NSP2 fusion may be conformationally defective. These results are not without precedent, as failure in the identification of other known protein-protein interactions in the two-hybrid system has been reported [1, 13].

#### **Deletion mapping of the NSP1-NSP3 interaction**

Since a complex between NSP1 and NSP3 can be suspected to have an important function in the viral replication cycle (see discussion), and the association between these two proteins was the strongest observed, we constructed a series of gene deletions, in an attempt to map the protein domains responsible for their association (Table 2). The results obtained showed that deletions in any region of NSP1 completely abolished the reactivity of this protein with NSP3; the exception being the deletion of 6 amino acids at the carboxy terminus of NSP1, which produced a mutant protein having a 5-fold increment in reactivity with NSP3 (Table 2A). We also attempted to determine whether interacting domains of NSP3 with NSP1 could be defined in the two-hybrid system. We constructed NSP3 fusions to both GAL4 domains (GAD and GBD) in which amino acids 222 to 309 (NSP3 $\Delta$ 222-309) or 172 to 315 (NSP3 $\Delta$ N22, $\Delta$ C172) were deleted. No interaction was detected between these NSP3 deletions and either full-length, or the 6 amino acid-short NSP1 proteins.

When the NSP3 deletions were tested against themselves, we found that mutant protein NSP3 $\Delta$ 222-309 lost its ability to associate with itself, but was able to interact with the full-length NSP3, albeit with much lower efficiency (Table 2B). On the other hand mutant protein NSP3 $\Delta$ N22,  $\Delta$ C172 was unable to associate with either the full-length or the deleted proteins. A third deletion construct of NSP3 (NSP3 $\Delta$ N172), in which the amino-terminal region of the protein was eliminated but retained the two carboxy-terminal domains that have been suggested to mediate dimerization [30], showed no interaction with any other NSP3 construct. Thus, although NSP3 may form multimers through the association of the two carboxy-terminal hydrophobic domains [30], it seems that the overall structure of the protein is important for this interaction, or alternatively, a domain of the protein, other than the carboxy terminus, participates directly in this interaction. The results obtained with this series of deletions suggest that either the deletions that were evaluated do not acquire a proper folding as fusions with the GAL4 domains, or the interaction between NSP1 and NSP3 is highly dependent on the overall conformation of both proteins.

#### **Biochemical analysis of the rotavirus NS protein interactions.**

To look for evidence of interactions among the rotavirus NS proteins in virus-infected cells, MA104 cells infected with rotavirus YM were metabolically labeled with [ $^{35}$ S]methionine, and the proteins in the cleared lysates were analyzed by immunoprecipitation with monospecific sera directed to the individual NS proteins. To obtain these sera, plasmids for expression of NSP1, NSP2, NSP3, and NSP5 as fusion proteins with GST were constructed, and the hybrid polypeptides synthesized in *E. coli* were used to raise antibodies in rabbits and/or mice. These sera were shown to specifically react with a single rotavirus protein by western blot analysis (data not shown). The proteins from virus-infected cells lysed under non-denaturing conditions were immunoprecipitated with these sera and analyzed by SDS-PAGE. Each of the hyperimmune sera tested, precipitated a major band corresponding to the expected NS protein (Fig. 1); furthermore,

in addition to the corresponding band, a faint but reproducible band with the molecular weight of NSP1 was obtained with the anti-NSP2, -NSP3, and -NSP5 sera, suggesting an association of these NS proteins to NSP1. The anti-NSP1 serum did not, however, co-immunoprecipitate any of the other NS proteins; this result can not be clearly explained, but suggests that the polyclonal antibodies elicited by GST-NSP1 are able to compete the interaction of any of the other NS polypeptides with NSP1. Other bands corresponding to VP2, VP6, and probably VP3 or VP4 were also obtained in each case; however, these bands were also observed when no antibody (Fig. 1), or when other anti-rotavirus sera (not shown) were used in the assay, and are therefore considered non-specific background. Identical results were obtained when the cell lysates were treated with RNase prior to immunoprecipitation (not shown), indicating that co-precipitation of NSP1 with the other NS proteins is not a consequence of their known ability to associate with RNA.

The NSP5-NSP6 interaction could not be detected by this immunoprecipitation assay, however, this is not entirely surprising since the interactions between rotavirus NS proteins have not been easy to identify [25, 30, 41], suggesting that their association is not very strong. In this regard, the two-hybrid system has successfully detected very weak protein-protein interactions that could not be detected by other methods [1, 45].

### **Subcellular localization**

To evaluate whether the rotavirus NS proteins share a spatial distribution within the cells, we performed double labeling experiments in MA104 cells infected with rotavirus YM. The NS proteins were detected by immunofluorescence staining of Triton X-100-permeabilized cells, using monospecific polyclonal sera against each of the proteins. A combination of mouse and rabbit monospecific sera was used to obtain double labeling with fluorescein- and rhodamine-conjugated antibodies. As a control within each experiment, mock-infected cells were stained and examined under identical conditions. Samples were analyzed by confocal microscopy as described in Methods. We observed that

the individual localization of each of the NS proteins corresponded to that previously reported (Fig. 2) [18, 30, 38]. NSP1 was distributed throughout the cytoplasm in a more or less homogeneous pattern; NSP3 was distributed in a punctuated pattern throughout the cytoplasm, although it seems to be more abundant closer to the perinuclear region; NSP2 and NSP5 were localized to viroplasmic inclusions. When double staining was examined on coincident confocal planes of 0.54 microns, we observed that the NSP3 granules seemed to be embedded in the diffusely distributed NSP1 (Fig. 2); on the other hand, NSP3 appeared to be excluded from the NSP2-containing viroplasmas. NSP2 showed a complete coincidence with the distribution of NSP5. A spatial overlap was also observed between NSP1 and NSP2, and between NSP1 and NSP5, although this overlapping seems to be less clear than for NSP1 and NSP3. While the pattern of distribution of NSP1 is almost homogeneous throughout the cytoplasm, and it would seem that by double labeling it could coincide with any other protein staining; analysis of specific confocal planes allowed us to discern between mere addition of color staining and true coincidence in distribution. The results obtained suggest that the interactions observed by the two-hybrid system and biochemical analysis of infected cells, should have the opportunity to occur as judged by the intracellular localization of the proteins involved.

## **Discussion**

In this study we have examined the potential interactions existing among the NS proteins of rotavirus both *in vivo* and *in vitro*. Using the yeast two-hybrid system, it was determined that proteins NSP2, NSP3, NSP5, and NSP6 interact with NSP1, and that NSP5 forms homodimers and interacts with NSP6. All these interactions appear to be weak, since the activation of the *lacZ* reporter gene induced by the interactions between NSP1 and the other NS proteins was about 5 to 10 times lower than that obtained with the interaction between p53 and the SV40 large T-antigen, a well characterized and relatively strong protein-protein interaction [26]. In the case of the NSP5-NSP5 and NSP5-NSP6 interactions, the  $\beta$ -galactosidase activity was 80 to 130 times lower than the positive control. The interaction among rotavirus NS proteins could be expected to be of transient nature if, as it has been proposed, they serve a regulatory role in the viral growth cycle [34]. The weakness of the interactions is also not surprising, given the fact that with exception of the NSP2-NSP5 interaction recently detected using the two-hybrid system [41], no heterocomplexes involving the NS proteins have been found when *in vitro* methods have been used. Using the two-hybrid system, Rossi et al. [45] reported an interaction between Nef and CD4 that could not be obtained by other methods. This interaction was described using the same two-hybrid vectors as those used in our study, and resulted in enzyme activity values comparable to those we obtained with the rotavirus NS proteins.

Although the relative strength of the interactions obtained in yeast does not necessarily reflect the stability of the interactions in rotavirus-infected cells, the formation of homodimers between NSP3 proteins in the two-hybrid system resulted in enzyme activity values comparable to those produced by the interactions of NSP1 with other NS proteins, suggesting that the strength of the latter interactions may be similar to that of the NSP3 multimerization *in vivo*.

Immunofluorescence double staining of rotavirus-infected cells allowed us to study the distribution of pairs of NS proteins in the same cell; furthermore, the use of confocal microscopy to analyze the generated images, permitted us to examine the distribution of each of these proteins in thin confocal planes. As expected, an almost absolute co-localization was observed between viroplasmic proteins NSP2 and NSP5; in addition, most of NSP3 was also highly coincident with NSP1, although this coincidence was asymmetric since only a small proportion of the latter protein co-localized with NSP3. On the other hand, NSP2 and NSP5 showed a lower degree of co-distribution with NSP1, and no coincidence was observed between NSP2 and NSP3. Although an interaction is not implied by the fact that two proteins coincide in their intracellular distribution; we nevertheless observed that the same proteins that were seen to interact by the two-hybrid system shared varying degrees of co-localization in the infected cell.

The observation that each of the NS proteins tested is able to interact with NSP1 suggests an important role for NSP1 in the replication cycle of the virus. It is puzzling however, that rotavirus variants that synthesize truncated versions of the protein, containing as little as the 40 amino-terminal amino acid residues are viable [20, 21, 47, 48]. This rotavirus variant however, has been shown to produce much smaller plaques than its parental strain [48]; the growth limitation of this virus may reflect the complete or partial inability of NSP1 to interact with the other NS proteins. It would be interesting to determine whether the rotavirus variant's limitations for growth are at the level of protein synthesis, RNA replication or virion assembly.

The observation by Xu et al. [51], that the predicted secondary structure of 17 NSP1 proteins from different rotavirus strains is highly conserved, even though their primary structure is among the least conserved, is suggestive that a selective pressure exists to avoid amino acid changes that alter the protein's overall structure. It has been proposed that this selective pressure could stem from interaction with cellular proteins [6, 32], or from the property of NSP1 to specifically bind to the 5' end of viral mRNAs [19]. The



results described in this work suggest that a conformational selective pressure on NSP1's overall structure could also be exerted through interactions with the other NS proteins.

Although speculative, the fact that NSP1 seems to interact with four other NS proteins, suggests that the association with each of them may occur at a different stage of the replication cycle of the virus, in which the interaction with one of the proteins may be dislodged by others, as it is indeed suggested by our coimmunoprecipitation experiments. A general framework for the functions of the NS proteins in the replication process of rotavirus has been suggested by Patton [34]. In this model it is proposed that, given the distribution and relative abundance in the cell of NSP1 and NSP3, most of the viral mRNAs are anchored to the cytoskeleton through the interaction of their 3' end with NSP3, and only a portion of these mRNAs are interacting, through their 5' end, with NSP1. The mRNAs interacting only with NSP3 would have a free 5' end to initiate translation, while those that are also bound by NSP1 would be blocked for translation, and could serve as templates for genome replication. Thus, the role of the NSP1-mRNA interaction would be a regulatory one to maintain a balance between mRNA translation and replication [34]. If the role of NSP1 is to bind to the 5' end of viral mRNAs to prevent the entry of ribosomes, and direct this subpopulation of mRNAs towards replication rather than translation, then in the absence of NSP1 the ribosome-free mRNAs population would be stochastically defined rather than established by a finely regulated mechanism. Under these conditions one would expect that the NSP1-deficient virus described above could still replicate albeit with lower efficiency as compared to the wild-type virus, as it has indeed been observed [48].

In the model proposed by Patton [34], NSP1 and NSP3 in the NSP1/NSP3-mRNA complex are competitively displaced by VP1 (which binds to the 3' end of the mRNA) and VP3 (which has been suggested to bind an mRNA sequence that probably overlaps that of NSP1), releasing the mRNA from its anchor to the cytoskeleton, and allowing the VP1-mRNA-VP3 complex to then travel to the viroplasm where RNA replication and virus particle assembly occur. In this context, the interaction of NSP1 with NSP3 in the

**NSP1/NSP3-mRNA complexes, may lower the affinity of one or both proteins for the viral mRNA, facilitating their replacement by VP1 and VP3. Alternatively, the interaction of NSP1 with NSP3 could serve to dislodge the mRNA from NSP3, and the NSP1-mRNA complex (with or without VP1 attached to the mRNAs' 3' end), could be then directed, possibly in association with a cytoskeleton element (since, as NSP3, NSP1 has also been shown to be bound to the cytoskeleton), to the viroplasmic inclusions. Once in the viroplasm, the 3' end of the mRNA would be occupied by VP1; and NSP1 in the 5' end would be competitively displaced by VP3. The displacement of NSP1 by VP3 could be facilitated by the interaction of the former protein with NSP2; recruitment to these complexes of VP2 would form the core replication intermediate [14, 34].**

**The role played in this scheme by multimers of NSP5, the interaction of NSP5 with NSP6, and the association of these two proteins with NSP1 is not possible to assess with the available information. NSP5 however, was recently reported to form dimers and to interact with NSP2 [41]. Since NSP2 is associated with replicating viral mRNAs as part of replication intermediate complexes having replicase activity [34], it was proposed that NSP5 could be part of these complexes [41], and thus it is also reasonable to assume that NSP6 would be present in these complexes, through its interaction with NSP5.**

**The series of interactions between the rotavirus NS proteins described in the present study underscore the highly coordinated nature of the events in which these proteins must participate during genome expression, replication and assortment. However extensive studies are still required to confirm the role of these proteins, and the functional relevance of the interactions described.**

## **Acknowledgments**

**We acknowledge the excellent technical assistance of Pedro Romero in the construction of some of the GST expression plasmids and the preparation of hyperimmune sera. We are also thankful to Xochitl Alvarado for assistance in confocal microscopy and to Elizabeth Mata for assistance with animal handling. We would like to thank Harry B. Greenberg of Stanford University for providing monoclonal antibody 952/122. This work was partially supported by grants 75197-527106 from the Howard Hughes Medical Institute, and G0012-N9607 from the National Council for Science and Technology-Mexico.**

## **Figure legends**

**Fig. 1 Interaction of NSP2, NSP3, and NSP5 with NSP1 in rotavirus-infected cells. Immunoprecipitation was carried out as described in Methods. Hyperimmune rabbit sera, monospecific for NSP1, NSP2, NSP3, and NSP5 were used as indicated. A polyclonal anti-rotavirus serum, elicited to porcine strain YM ( $\alpha$ RV), was used to obtain a distinct pattern of rotavirus proteins. A control immunoprecipitation, in which no antibody was used (no Ab.) is shown. Immunoprecipitated bands corresponding to the nonstructural proteins, as well as structural proteins VP2 and VP6 are indicated. The asterisk indicates bands that may correspond to structural proteins VP3, VP4, and/or VP2 degradation products.**

**Fig. 2 Subcellular localization of rotavirus nonstructural proteins by double immunofluorescence confocal imaging of rotavirus-infected cells. MA 104 cells infected with rotavirus YM were stained using monospecific sera for NSP1, NSP3, NSP5, or monoclonal antibody 952/191 directed to NSP2 [4], and fluorescein isothiocyanate-labeled anti-mouse (left panels) or rodamine-labeled anti-rabbit (central panels) conjugated antibodies. Double staining of coincident confocal planes is shown on the right panels; controls in which mock-infected cells were stained with combinations of the relevant antibodies are shown on the bottom panels.**

## **References**

- 1. Aelst LV, Barr M, Marcus S, Polverino A, Wigler M (1993) Complex formation between RAS and RAF and other protein kinases. Proc Natl Acad Sci USA 90: 6213-6217**
- 2. Au KS, Chan WK, Burns JW, Estes MK (1989) Receptor activity of rotavirus nonstructural glycoprotein NS28. J Virol 63: 4553-62**
- 3. Bartel PL, Chien CT, Sternglanz R, Fields S (1993) Using the two-hybrid system to detect protein-protein interactions. Oxford University Press, Oxford**
- 4. Bass DM, Mackow ER, Greenberg HB (1990) NS35 and not vp7 is the soluble rotavirus protein which binds to target cells. J Virol 64: 322-30**
- 5. Breeden L, Nasmyth K (1985) Regulation of yeast HO gene. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York**
- 6. Bremont M, Charpilienne A, Chabanne D, Cohen J (1987) Nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding the nonstructural protein NCVP2 of bovine rotavirus. Virology 161: 138-144**
- 7. Chen D, Ramig RF (1993) Rescue of infectivity by in vitro transcapsidation of rotavirus single-shelled particles. Virology 192: 422-429**
- 8. Chen D, Zeng CQ, Wentz MJ, Gorziglia M, Estes MK, Ramig RF (1994) Template-dependent, in vitro replication of rotavirus RNA. J Virol 68: 7030-9**

9. Durfee T, Becherer K, Chen PL, Yeh SH, Yang Y, Kilburn AE, Lee WH, Elledge SJ (1993) The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes & Dev* 7: 555-569
10. Ericson BL, Graham DY, Mason BB, Estes MK (1982) Identification, synthesis, and modification of simian rotavirus SA11 polypeptides in infected cells. *J Virol* 42: 825-839
11. Estojak J, Brent R, Golemis EA (1995) Correlation of two-hybrid affinity data with *in vitro* measurements. *Mol Cell Biol* 15: 5820-5829
12. Fields O, Song O (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340: 245-247
13. Fields S, Sternglanz R (1994) The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends Gen* 10: 286-292
14. Gallegos CO, Patton JT (1989) Characterization of rotavirus replication intermediates: a model for the assembly of single-shelled particles. *Virology* 172: 616-27
15. Gombold JL, Ramig RF (1987) Assignment of simian rotavirus SA11 temperature-sensitive mutant groups A, C, F, and G to genome segments. *Virology* 161: 463-73
16. Helmberger JM, Patton JT (1986) Characterization of subviral particles in cells infected with simian rotavirus SA11. *Virology* 155: 655-65

17. Holt KH, Olson AL, Moye-Rowley WS, Pessin JE (1994) Phosphatidylinositol 3-kinase activation is mediated by high-affinity interactions between distinct domains within p110 and p85 subunits. *Mol Cell Biol* 14: 42-49
18. Hua J, Chen X, Patton JT (1994) Deletion mapping of the rotavirus metalloprotein NS53 (NSP1): the conserved cysteine-rich region is essential for virus-specific RNA binding. *J Virol* 68: 3990-4000
19. Hua J, Mansell EA, Patton JT (1993) Comparative analysis of the rotavirus NS53 gene: conservation of basic and cysteine-rich regions in the protein and possible stem-loop structures in the RNA. *Virology* 196: 372-8
20. Hua J, Patton JT (1994) The carboxyl-half of the rotavirus nonstructural protein NS53 (NSP1) is not required for virus replication. *Virology* 198: 567-76
21. Hundley F, Biryahwaho B, Gow M, Desselberger U (1985) Genome rearrangements of bovine rotavirus after serial passage at high multiplicity of infection. *Virology* 143: 88-103
22. Johnson MA, McCrae MA (1989) Molecular biology of rotaviruses VIII. Quantitative analysis of regulation of gene expression during virus replication. *J Virol* 63: 2048-2055
23. Kalpana GV, Goff SP (1993) Genetic analysis of homomeric interactions of human immunodeficiency virus type 1 integrase using the yeast two-hybrid system. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90: 10593-10597

24. **Kapikian AZ, Chanock RM (1990) Rotaviruses. Raven Press, New York**
25. **Kattoura MD, Chen X, Patton JT (1994) The rotavirus RNA-binding protein NS35 (NSP2) forms 10S multimers and interacts with the viral RNA polymerase. Virology 202: 803-13**
26. **Li B, Fields S (1993) Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 T antigen by using the yeast two-hybrid system. FASEB J 7: 957-963**
27. **Liu M, Mattion NM, Estes MK (1992) Rotavirus VP3 expressed in insect cells possesses guanylyltransferase activity. Virology 188: 77-84**
28. **Lopez S, Arias CF (1993) Protein NS26 is highly conserved among porcine rotavirus strains. Nucleic Acid Res 21**
29. **Ma J, Ptashne M (1987) A new class of yeast transcriptional activators. Cell 51: 113-119**
30. **Mattion NM, Cohen J, Aponte C, Estes MK (1992) Characterization of an oligomerization domain and RNA-binding properties on rotavirus nonstructural protein NS34. Virology 190: 68-83**
31. **Miller JH (1972) Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY**



32. Mitchell DB, Both GW (1990) Conservation of a potential metal binding motif despite extensive sequence diversity in the rotavirus nonstructural protein NS53. *Virology* 174: 618-21
33. Palombo EA, Bishop RF (1994) Genetic analysis of NSP1 genes of human rotaviruses isolated from neonates with asymptomatic infection. *J Gen Virol*
34. Patton JT (1995) Structure and function of the rotavirus RNA-binding proteins. *J Gen Virol* 76: 2633-44
35. Patton JT, Gallegos CO (1988) Structure and protein composition of the rotavirus replicase particle. *Virology* 166: 358-65
36. Patton JT, Gallegos CO (1990) Rotavirus RNA replication: single-stranded RNA extends from the replicase particle. *J Gen Virol*
37. Patton JT, Wentz M, Xiaobo J, Ramig RF (1996) cis-Acting Signals that Promote Genome Replication in Rotavirus mRNA. *J Virol* 70: 3961-3971
38. Petric BL, Greenberg HB, Graham DY, Estes MK (1984) Ultrastructural localization of rotavirus antigens using colloidal gold. *Virus Res* 1: 133-52
39. 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. *J Virol* 67: 3159-65
40. Poncet D, Laurent S, Cohen J (1994) Four nucleotides are the minimal requirement for RNA recognition by rotavirus non-structural protein NSP3. *EMBO J* 13: 4165-73

41. 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. *J Virol* 71: 34-41
42. Prasad BV, Burns JW, Marietta E, Estes MK, Chiu W (1990) Localization of VP4 neutralization sites in rotavirus by three-dimensional cryo-electron microscopy. *Nature* 343: 476-9
43. Prasad BV, Chiu W (1994) Structure of rotavirus. *Curr Top Microbiol Immunol* 185: 9-29
44. Ramig RF, Petrie BL (1984) Characterization of temperature-sensitive mutants of simian rotavirus SA11: protein synthesis and morphogenesis. *J Virol* 49: 665-73
45. Rossi F, Gallina A, Milanesi G (1996) NEF-CD4 physical interaction sensed with the yeast two-hybrid system. *Virology* 217: 397-403
46. Sandino AM, Jashes M, Faundez G, Spencer E (1986) Role of the inner protein capsid on *in vitro* human rotavirus transcription. *J Virol* 60: 797-802
47. Taniguchi K, Kojima K, Urasawa S (1996) Nondefective rotavirus mutants with an NSP1 gene which has a deletion of 500 nucleotides, including a cysteine-rich zinc finger motif-encoding region (nucleotides 156 to 248), or which has a nonsense codon at nucleotides 153 to 155. *J Virol* 70: 4125-4130

- 48. Tian Y, Tarlow O, Ballard A, Desselberger U, McCrae MA (1993) Genomic concatemerization/deletion in rotaviruses: a new mechanism for generating rapid genetic change of potential epidemiological importance. J Virol 67: 6625-6632**
- 49. Valenzuela S, Pizarro J, Sandino AM, Vasquez M, Fernandez J, Hernandez O, Patton J, Spencer E (1991) Photoaffinity labeling of rotavirus VP1 with 8-azido-ATP: identification of the viral RNA polymerase. J Virol 65: 3964-7**
- 50. Vasquez M, Sandino AM, Pizarro JM, Fernandez J, Valenzuela S, Spencer E (1993) Function of rotavirus VP3 polypeptide in viral morphogenesis. J Gen Virol**
- 51. Xu L, Tian Y, Tarlow O, Harbour D, McCrae MA (1994) Molecular biology of rotaviruses. IX. Conservation and divergence in genome segment 5. J Gen Virol 75: 3413-3421**
- 52. Yang X, Hubbard E, Carlson M (1992) A protein kinase substrate identified by the two hybrid system. Science 257: 680-682**

**Table 1. *In vivo* interactions among rotavirus nonstructural proteins by the two-hybrid system.**

GAL4 Activation domain (pGAD424)	GAL4 Binding domain (pGBT9)	Blue phenotype <sup>a</sup> (X-GAL)	U.β-gal (±SD). <sup>b</sup> (ONPG)
NSP3	NSP1	+++	3.42±0.90
NSP2	NSP1	++	2.09±0.40
NSP5	NSP1	++	1.68±0.18
NSP6	NSP1	++	2.40±0.42
VP2	NSP1	+	0.72±0.01
pGAD424	NSP1	+	0.66±0.17
NSP3	NSP3	+++	1.31±0.10
VP2	NSP3	+	0.25±0.07
pGAD424	NSP3	+	0.30±0.19
NSP3	VP2	-	0
NSP5	NSP5	+	0.14±0.02
NSP6	NSP5	++	0.24±0.10
VP2	NSP5	-	0
pGAD424	NSP5	-	0
NSP6	pGBT9	-	0
T-SV40	p53	++++	22.10±4.23
pGAD424	pGBT9	-	0.01± 0.01

Results shown for blue phenotype are representative of at least three independent experiments.

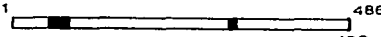
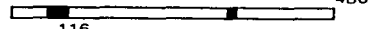
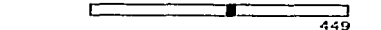
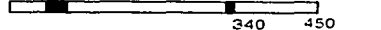
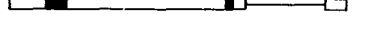
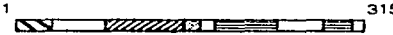
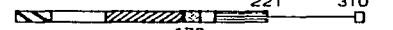
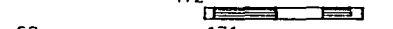

Results for quantification of enzyme activity are the average measurement obtained from 4 independent experiments, each performed in triplicate±standard deviation (SD), except for NSP6-NSP1, NSP5-NSP5, NSP6-NSP5, GAD-NSP5, VP2-NSP1, VP2-NSP3 and VP2-NSP5 which are the result from one experiment performed in triplicate±SD.

<sup>a</sup>Blue color appearance: +++++, ≤ 60 min; +++, ≤ 180 min; ++, ≤ 240 min;

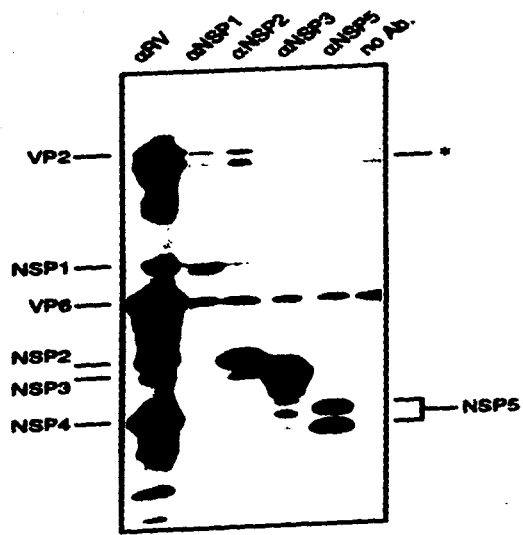
+, ≤ 480 min; -, no color up to 24 h.

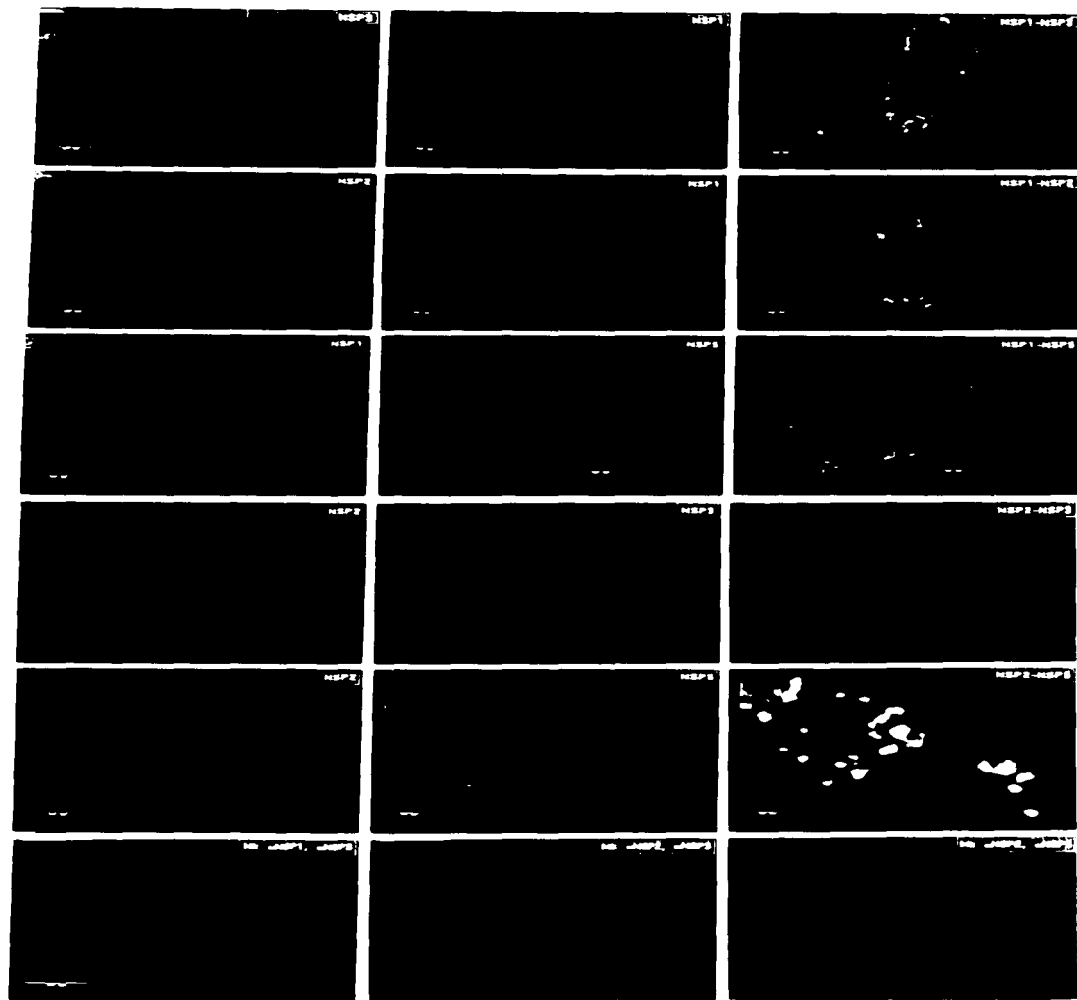
<sup>b</sup>Units of β-galactosidase = 1000 x OD<sub>405nm</sub> / OD<sub>600nm</sub> x vol. x time

**Table 2.** Effect of deletions of NSP1 and NSP3 on their interaction in the two-hybrid system.

A	GBD-NSP1	GAD-NSP3			
		NSP3	NSP3Δ 222-309	NSP3 23-171	pGAD424
NSP1		+++ <sup>a</sup>	+	+	+
NSP1ΔC-481		+++++	+++	+++	+++
NSP1ΔN-115		-	-	-	-
NSP1ΔC-450		-	ND	ND	-
NSP1Δ341-449		-	ND	ND	-
<b>B</b>					
	GBD-NSP3				
NSP3		+++	+	+	+
NSP3Δ222-309		+	-	-	-
NSP3ΔN-172		-	-	ND	-
NSP3 / 23-171		ND	ND	ND	ND
pGBT9		-	-	-	-

<sup>a</sup> Blue color appearance: +++++, ≤60 min; +++, ≤180 min; +, ≤480 min; -, no color up to 24 h. ■, zinc finger-like regions, aa 53-87 and 315-328 in rotavirus YM; ▨, non-charged region, aa 1-30; ▩, basic region, aa 81-150; ▤, acidic region, aa 151-169; ▥, heptad repeat, aa 181-236; ▦, leucine zipper, aa 275-305.





## **Interacción entre proteínas no estructurales de rotavirus en la levadura HF7c.**

Con el fin de obtener evidencia adicional sobre la especificidad de las interacciones detectadas con el sistema de dos-híbridos entre las proteínas no estructurales, se utilizó la cepa de levadura HF7c para demostrar que dichas interacciones pueden detectarse cuando el gene reportero de  $\beta$ -galactosidasa se encuentra bajo el control de un promotor diferente.

Mientras que en la cepa de levadura SFY526 el gene de  $\beta$ -galactosidasa se encuentra bajo el control de las secuencias activadoras de la transcripción (UAS) y la porción TATA del promotor de GAL1, en la cepa HF7c el gene *lacZ* está fusionado a la porción TATA del promotor CYC1 y a tres copias de un diecisieteámero de un sitio de unión para GAL4. Tanto las UAS de GAL1, como los diecisieteámeros de GAL4 responden al activador de GAL4. Por otra parte en la cepa HF7c el gene *HIS3*, el cual se encuentra bajo el control de elementos regulatorios de GAL1, funciona como un reportero adicional ya que en ausencia de histidina en el medio de cultivo, el crecimiento de las levaduras transformantes depende de la activación de la transcripción del gene *HIS3* por GAL4 (Bartel *et al.*, 1993; Feilotter *et al.*, 1994).

Todas las combinaciones de proteínas incluidas en la Tabla 1 del artículo anexo, fueron evaluadas en la cepa HF7c. Las mismas interacciones detectadas entre las proteínas no estructurales en la cepa SFY526, fueron también detectadas en la cepa HF7c. Estos experimentos mostraron que la activación de la transcripción obtenida en nuestros ensayos es independiente del promotor y del gene reportero utilizado y que depende únicamente de la interacción entre las proteínas no estructurales.



## **Reactividad específica de los anticuerpos dirigidos contra las proteínas no estructurales.**

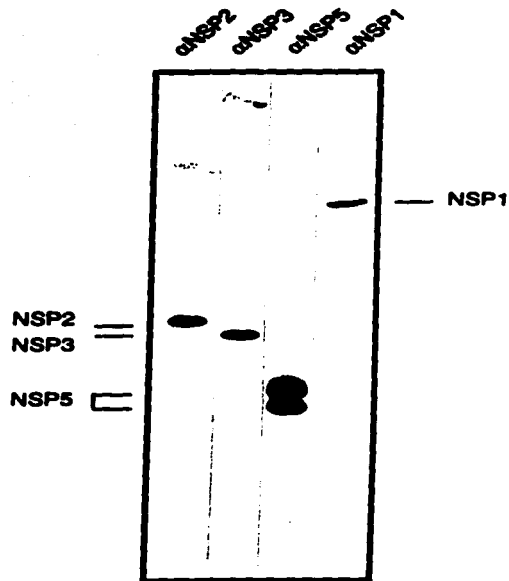
**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Para buscar evidencia de las interacciones entre las proteínas no estructurales detectadas con el sistema de los dos-híbridos en células MA104 infectadas con rotavirus, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación como se describe en el artículo anexo (Fig. 1).

La especificidad de los anticuerpos dirigidos contra las proteínas no estructurales utilizados en estos ensayos fue evaluada por inmunodetección (western blot). Con cada uno de los sueros se obtuvo una banda única con el peso molecular de la proteína no estructural correspondiente (excepto en el caso de los anticuerpos dirigidos contra NSP5 que reconocen las dos bandas mayoritarias esperadas, correspondientes a NSP5 con diferentes modificaciones postraduccionales (Fig. 13).

## **Localización intracelular de proteínas estructurales y no estructurales de rotavirus.**

La distribución intracelular de cada una de las proteínas de rotavirus había sido previamente descrita utilizando inmunomicroscopía electrónica o inmunofluorescencia (Mattion *et al.*, 1994). La descripción de su localización ha sido importante para tener una idea más clara de cual puede ser su función en el ciclo de replicación; las proteínas no estructurales NSP1 y NSP3 se distribuyen en todo el citoplasma (probablemente en asociación con el citoesqueleto), mientras que NSP2, NSP5, NSP6 y las proteínas estructurales VP2, VP6 y probablemente VP1 y VP3 se localizan en viroplasmatas. Sin embargo, el estudio de la distribución de más de una de estas proteínas en la misma célula no ha sido reportado.



**Figura 13.** Inmunoelectrotransferencia (Western blot), se muestra la reactividad específica de cada uno de los sueros dirigidos contra las proteínas NSP1, NSP2, NSP3 y NSP5.

En este trabajo, como se describe en el artículo anexo, realizamos el análisis de la distribución de las proteínas no estructurales por pares en la misma célula, utilizando microscopía confocal y doble inmunofluorescencia. El análisis de planos focales de 0.54  $\mu\text{m}$  de espesor permitió determinar que existen distintos grados de coincidencia en el espacio ocupado por las diferentes proteínas no estructurales.

Como se ha mencionado, una de las evidencias que sugieren un papel importante para las proteínas no estructurales en la replicación del virus, es su asociación con las partículas RI. Dado que en la morfogénesis de estas partículas están asociadas proteínas que están distribuidas más o menos uniformemente en el citoplasma (NSP1 y NSP3), al igual que proteínas vioplásmicas, este proceso debe de involucrar una distribución ordenada de cada una de las proteínas que participan en los diferentes estadios.

Con el fin de estudiar la distribución de las proteínas que forman parte de las partículas RI, se analizó por microscopía confocal y doble inmunofluorescencia, la localización de diferentes pares de proteínas estructurales y no estructurales de localización vioplásmica, en células MA104 infectadas con rotavirus.

### **Distribución de VP2 y NSP2**

La formación de la partícula "core RI" involucra la adición de las proteínas VP2, NSP2 y NSP5 a los "precore RI". Se ha mencionado también que mientras las proteínas NSP1 y NSP3 (asociadas a los "precore RI") se distribuyen en el citoplasma, las proteínas VP2, NSP2 y NSP5 tienen una distribución claramente vioplásmica. El análisis de la distribución de las proteínas NSP2 y NSP5 mostró que estas dos proteínas tienen una coincidencia completa en el espacio intracelular que ocupan (Fig. 2, Artículo anexo).

Por otra parte, al analizar la distribución de las proteínas VP2 y NSP2, observamos que en la misma preparación, existen dos tipos de distribución: En algunas células la

distribución de estas dos proteínas es completamente coincidente, mientras que en una proporción equivalente de las células analizadas, se observa una organización diferente. Aunque en algunos espacios hay una coincidencia abundante en la localización de VP2 y NSP2, existen también regiones en las que estas proteínas parecen ocupar espacios viroplásmicos distintos (Fig. 14).

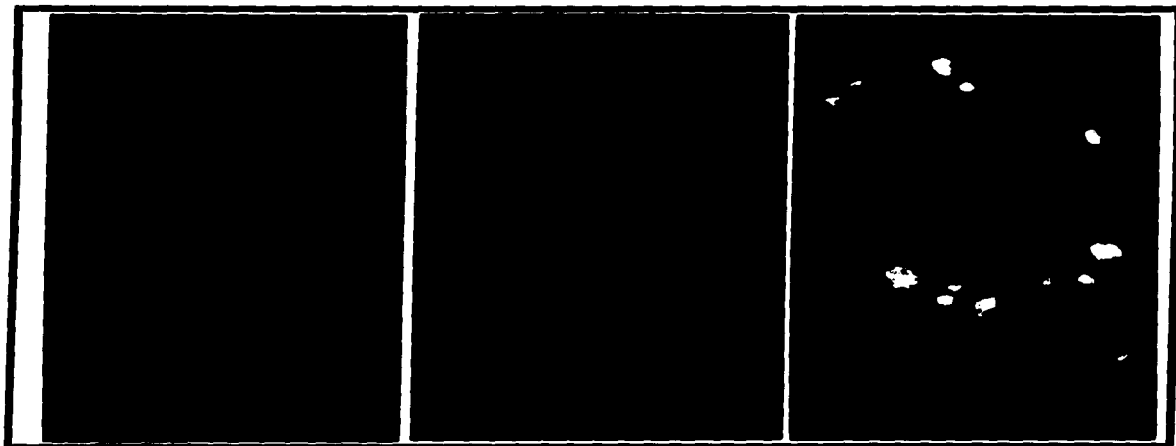
### **Distribución de VP6 y NSP2**

Después de la formación del "core" RI, la adición de VP6, lleva a la formación de la partícula "VP6 RI". La adquisición de VP6 debe excluir de manera gradual a las proteínas NSP2 y NSP5 para permitir la formación de las partículas de doble capa.

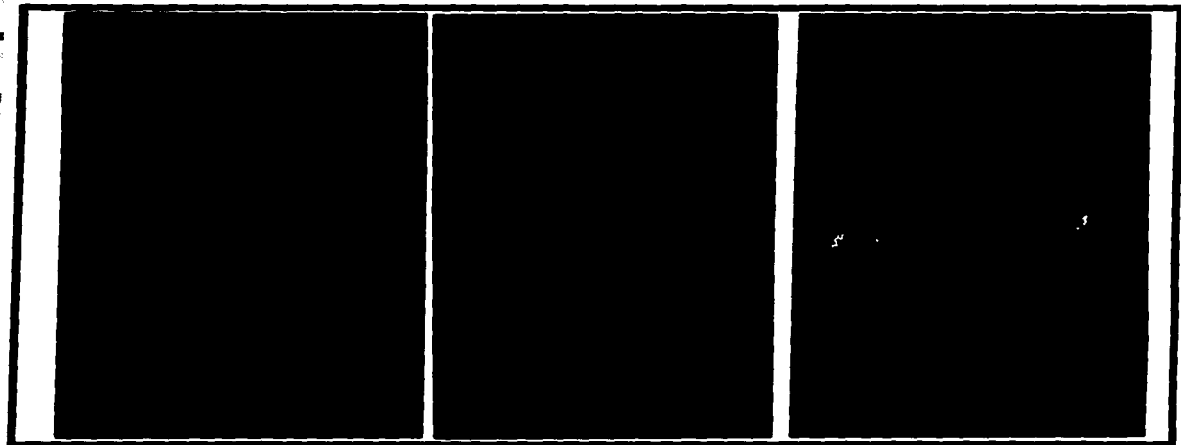
La localización de VP6, mostró una distribución en la periferia de los viroplasmas con un patrón en forma de anillo. NSP2 en cambio, ocupó la totalidad del volumen de los viroplasmas. La coincidencia en la distribución entre estas dos proteínas fué completa, aunque esta coincidencia es asimétrica, ya que los anillos formados por VP6 están embebidos en su totalidad, en el volumen ocupado por NSP2 (Fig. 15).

### **Distribución de VP6 y NSP5**

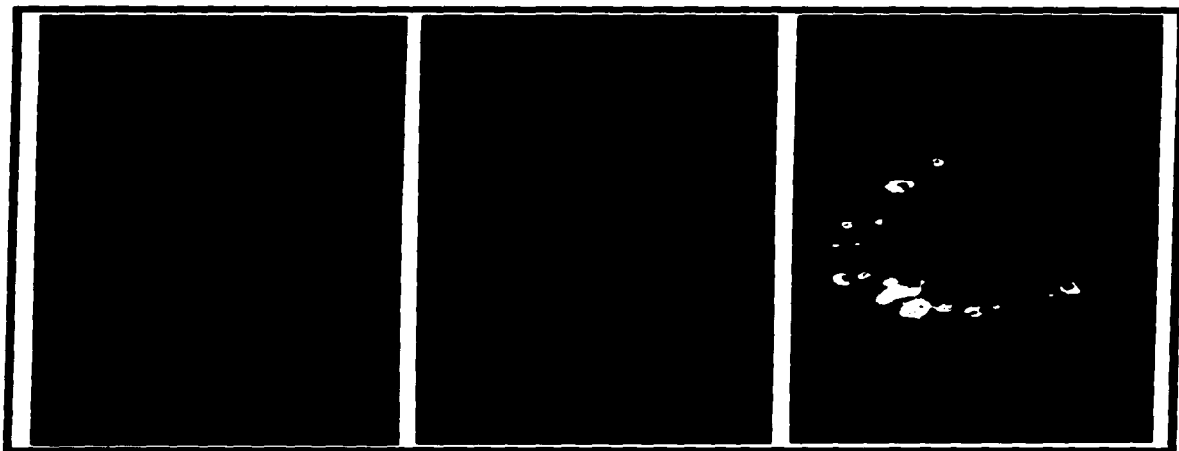
Al analizar la distribución de VP6 y NSP5, encontramos que al igual que VP2 y NSP2, existen dos patrones de organización distinguibles en diferentes células. Mientras que en algunas células el volumen viroplásmico ocupado por NSP5 embebe completamente los anillos formados por VP6 en la periferia, en otras, estos anillos coinciden solo parcialmente con los espacios ocupados por NSP5 (Fig. 16)



**Figura 14.** Distribución intracelular de la proteína estructural VP2 y la proteína no estructural NSP2.



**Figura 15.** Distribución intracelular de la proteína estructural VP6 y la proteína no estructural NSP2.



**Figura 16.** Distribucion intracelular de la protefna estructural VP6 y la protefna no estructural NSP5.

## **Discusión**

En este trabajo describimos una serie de interacciones entre las proteínas no estructurales de los rotavirus. Utilizando el sistema genético de los dos-híbridos, encontramos que la proteína NSP1 interacciona con las proteínas NSP2, NSP3, NSP5 y NSP6; de la misma manera encontramos que la proteína NSP5 forma homodímeros e interacciona con NSP6. La capacidad de NSP3 de formar homodímeros *in vitro*, había sido reportada; mediante el sistema de los dos híbridos constatamos la dimerización de esta proteína *in vivo*.

La colocalización de algunas de las proteínas en la célula infectada nos muestra que aquellas proteínas con las que se encontraron interacciones *in vivo* e *in vitro*, coinciden en grados variables en el espacio intracelular que ocupan.

Por otra parte, mediante el análisis de la colocalización de proteínas que participan en la morfogénesis del "core", que se acumulan en viroplasmata, observamos que su distribución no es en todos los casos completamente coincidente. Mientras que las proteínas NSP2 y NSP5 coinciden en su totalidad en los espacios viroplásmicos que ocupan, el análisis de la distribución de las proteínas VP6 y VP2 reveló que estas proteínas no siempre coinciden con las regiones ocupadas por las proteínas NSP2 ó NSP5.

Estas observaciones sugieren que los viroplasmata no son inclusiones que se forman mediante la acumulación estocástica de proteínas y que por el contrario, existe una estructura organizada en la que cada una de las proteínas está ordenada en una distribución específica. Nuestros resultados sugieren además, que la formación de viroplasmata involucra un proceso dinámico en el que las proteínas destinadas a formar parte de éstos, se acumulan en regiones intracelulares definidas y se colocalizan de manera gradual con inclusiones viroplásmicas formadas por otras proteínas.



**Los resultados descritos en este trabajo, sugieren que en la formación del "core" existe una serie de interacciones finamente coordinada que modula y dirige la replicación y morfogénesis del virus.**

**La asociación entre NSP1 y NSP3 es sugerente de que su acción concertada está involucrada en el proceso de selección de los transcritos virales hacia la síntesis de proteínas o replicación del genoma (Fig. 17). Como se ha mencionado, la NSP3 interactúa con los extremos 3' de los mRNAs virales y probablemente está asociada al citoesqueleto; al reclutar y anclar a una subpoblación de los mRNAs al citoesqueleto, esta proteína podría estar involucrada en estimular la síntesis de proteínas (Cervera *et al.*, 1981; Mattion *et al.*, 1992; Patton, 1995; Poncet *et al.*, 1997). Considerando la abundancia relativa de NSP1 y NSP3, solo una subpoblación de los mRNAs asociados a NSP3, estaría unido a NSP1; la interacción de NSP1 con el extremo 5' de los mRNAs podría inhibir la síntesis de proteínas y estar involucrada en dirigir al complejo NSP1-mRNA-NSP3, posiblemente a través de la interacción con componentes del citoesqueleto, hacia regiones en donde se formarán los viroplasmias. Estos eventos podrían relacionarse a los cambios en la distribución de vimentina observados en células infectadas (Weclewicz *et al.*, 1994).**

**Se ha propuesto que la distribución de los segmentos de RNA del virus, para formar un genoma completo con los once segmentos correspondientes, podría ocurrir en esta etapa de la morfogénesis del virión; Mattion y colaboradores (1992), han sugerido que dada la propiedad de NSP3 de asociarse en varias especies multiméricas podría tener propiedades análogas a la proteína  $\sigma$ NS de los reovirus. Se ha sugerido que esta última podría desempeñar diferentes papeles mediante sus diversas formas multiméricas y que podría actuar como un agente de nucleación para el ensamblaje del genoma y de la nucleocápside (Mattion *et al.*, 1992).**

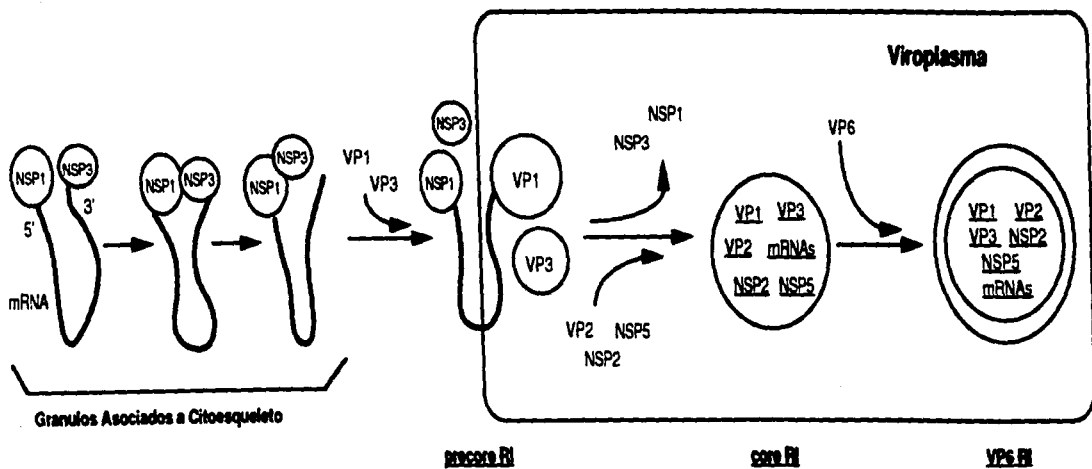


Figura 17. Papel de las proteínas no estructurales en el ciclo de replicación de los rotavirus.

El papel de la interacción entre NSP1 y NSP3 puede estar relacionado con los eventos iniciales de la formación de las partículas "precore RI". Por una parte la interacción de NSP1 con NSP3 podría ser responsable de desestabilizar la unión del complejo NSP3-mRNA con el citoesqueleto, permitiendo su transporte hacia los sitios en donde se formarán los viroplasmata. Por otra parte, la asociación entre NSP1 y NSP3 podría desestabilizar la unión de ambas proteínas con el mRNA, facilitando la interacción de VP1 con el extremo 3' de los mRNAs, así como de VP3 con el extremo 5'.

Una vez formados los "precore RI", la adición de las proteínas NSP2, VP2 y NSP5 resulta en los "core RI"; dado que estas proteínas se localizan en viroplasma, la formación de los "core RI" debe involucrar un contacto inicial de las proteínas viroplásmicas con componentes del "precore RI". NSP2 podría ser la proteína responsable de hacer este contacto a través de su capacidad de interactuar, tanto con RNA, como con VP1 (Kattoura *et al.*, 1994). La interacción entre NSP1 y NSP2 aquí descrita, podría facilitar el desplazamiento de NSP1 por VP3 en el extremo 5' de los mRNAs. Además de interactuar con VP1, NSP2 forma complejos multiméricos y es necesaria para la formación de viroplasma. La interacción de NSP2 con el "precore RI" podría estar por tanto involucrada no solo en el desplazamiento de NSP1 del mRNA, sino que podría funcionar como un complejo de nucleación en la formación de viroplasmata y de las partículas "core RI". Patton (1995) ha propuesto que la interacción de VP2 con los "precore RI" para formar el "core RI" podría igualmente ocurrir a través de su interacción con RNA, o con VP1 y VP3. Dada la capacidad intrínseca de VP2 de auto ensamblarse, cada complejo formado por VP1-mRNA-VP3 y NSP2 funcionaría así como centro de nucleación para la formación de estructuras pentaméricas consistentes en una molécula de este complejo y cinco dímeros de VP2, que se ensamblarían para completar el "core RI" (Patton, 1995).

Como se ha mencionado, la sensibilidad de los "core RI" a RNAsas sugiere que los mRNAs están expuestos en el exterior de la partícula, probablemente asociados con NSP2, NSP5 y NSP6 (Patton, 1986; Patton & Gallegos, 1990). Los mRNAs deben ser

**internalizados a medida que avanza la síntesis de los RNA(-), en la replicación del genoma; la pérdida gradual de NSP2, NSP5 y NSP6 debe estar dirigida por la entrada de los mRNAs al "core" y por la interacción de VP6 con VP2, culminando en la formación de los "VP6 RI" (Patton, 1995).**

**En este esquema general, es difícil deducir el papel de las interacciones de NSP5 con NSP6, la interacción de éstas con NSP1 o, la dimerización de NSP5, con la información disponible. Sin embargo, la interacción de NSP2 con NSP5 y su presencia en los "core RI", permite postular que la interacción de NSP5 con NSP1 y NSP6 cumple alguna función en la formación de estas partículas. La interacción de estas proteínas con complejos con actividad de replicasa, sugiere además que estén involucradas en coordinar el ensamble y replicación del genoma.**

## Referencias

- Altenburg, B. C., Graham, D. Y. & Estes, M. K. (1980). Ultrastructural study of rotavirus replication in cultured cells. *Journal of General Virology* **46**, 75-85.
- Arias, C. F., Romero, P., Alvarez, V. & López, 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. *Journal of Virology* **63**, 4553-62.
- Au, K. S., Mattion, N. M. & Estes, M. K. (1993). A subviral particle binding domain on the rotavirus nonstructural glycoprotein NS28. *Virology* **194**, 665-73.
- Bartel, P. L., Chien, C.-T., Sternglanz, R. & Fields, S. (1993). Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *BioTechniques* **14**, 920-924.
- Bergmann, C. C., Maass, D., Poruchynsky, M. S., Atkinson, P. H. & Bellamy, A. R. (1989). Topology of the non-structural rotavirus receptor glycoprotein NS28 in the rough endoplasmic reticulum. *Embo J* **8**, 1695-703.
- Bishop, R. F., Davidson, G. P., Holmes, I. H. & Ruck, B. J. (1973). Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with viral gastroenteritis. *Lancet*, 1281-1283.
- Blackhall, J., Fuentes, A., Hansen, K. & Magnusson, G. (1997). Serine protein kinase activity associated with rotavirus phosphoprotein NSP5. *Journal of Virology* **71**, 138-144.
- Both, G. W., Bellamy, A. R. & Mitchell, D. B. (1994). Rotavirus protein structure and function. *Curr Top Microbiol Immunol* **185**, 67-105.
- Both, G. W., Siegman, L. J., Bellamy, A. R. & Atkinson, P. H. (1983). Coding assignment and nucleotide sequence of simian rotavirus SA11 gene segment 10: location of glycosylation sites suggests that the signal peptide is not cleaved. *J Virol* **48**, 335-9.
- Bremont, M., Charpilienne, A., Chabanne, D. & Cohen, J. (1987). Nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding the nonstructural protein NCVP2 of bovine rotavirus. *Virology* **161**, 138-144.
- Brottier, P., Nandi, P., Bremont, M. & Cohen, J. (1992). Bovine rotavirus segment 5 protein expressed in the baculovirus system interacts with zinc and RNA. *J Gen Virol*.
- Cervera, M., Dreyfuss, G. & Penman, S. (1981). Messenger RNA is translated when associated with the cytoskeletal framework in normal and VSV-infected HeLa cells. *Cell* **23**, 113-120.
- 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**, 435-42.

- Chen, D., & Patton, J. T. (1997) Effects of terminal sequences on rotavirus RNA replication. VI International Symposium on Double Stranded RNA Viruses. Cocoyoc, Mor., México
- Choy, B., Roberts, S. G. E., Griffin, L. A. & Green, M. R. (1993). How eukaryotic transcription activators increase assembly of preinitiation complexes. In *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology*, pp. 199-203: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Cohen, J., Laporte, J., Charpilienne, A. & Scherrer, R. (1979). Activation of rotavirus RNA polymerase by calcium chelation. *Arch. Virol.*, 177-182.
- Coulson, B. S., Londrigan, S. L. & Lee, D. J. (1997). Rotavirus contains integrin ligand sequences and a disintegrin-like domain that are implicated in virus entry into cells. *PNAS* **94**, 5389-5394.
- Desselberger, U. & McCrae, M. A. (1994). The rotavirus genome. *Curr Top Microbiol Immunol* **185**, 31-66.
- Ericson, B. L., Graham, D. Y., Mason, B. B. & Estes, M. K. (1982). Identification, synthesis, and modification of simian rotavirus SA11 polypeptides in infected cells. *Journal of Virology* **42**, 825-839.
- 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**, 320-32.
- Espejo, R. T., Lopez, S. & Arias, C. (1981). Structural polypeptides of simian rotavirus SA11 and the effect of trypsin. *J Virol* **37**, 156-60.
- Estes, M. K. & Cohen, J. (1989). Rotavirus gene structure and function. *Microbiological Reviews* **53**, 410-49.
- Estes, M. K., Graham, D. Y. & Mason, B. B. (1981). Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: molecular mechanisms. *J Virol* **39**, 879-88.
- Feilotter, H. E., Hannon, G. J., Ruddel, C. J. & Beach, D. (1994). Construction of an improved host strain for two-hybrid screening. *Nucleic Acids Res.* **22**, 1502-1503.
- Fields, O. & Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245-247.
- Fiore, L., Greenberg, H. B. & Mackow, E. R. (1991). The VP8 fragment of VP4 is the rhesus rotavirus hemagglutinin. *Virology* **181**, 553-63.
- Fuentes, A., Blackhall, J. & Magnusson, G. (1997) Mechanism of rotavirus inhibition of host cell protein synthesis. VI International Symposium on Double Stranded RNA Viruses. Cocoyoc, Mor., México
- Fuentes Panama, E. M., Lopez, S., Gorziglia, M. & Arias, C. F. (1995). Mapping the hemagglutination domain of rotaviruses. *J Virol* **69**, 2629-32.

- Fukudome, K., Yoshie, O. & Konno, T. (1989). Comparison of human, simian, and bovine rotaviruses for requirement of sialic acid in hemagglutination and cell absorption. *Virology* **172**, 196-205.
- Fukuhara, N., Yoshie, O., Kitaoka, S. & Konno, T. (1988). Role of VP3 in human rotavirus internalization after target cell attachment via VP7. *J Virol* **62**, 2209-18.
- Gallegos, C. O. & Patton, J. T. (1989). Characterization of rotavirus replication intermediates: a model for the assembly of single-shelled particles. *Virology* **172**, 616-27.
- Gombold, J. L., Estes, M. K. & Ramig, R. F. (1985). Assignment of simian rotavirus SA11 temperature-sensitive mutant groups B and E to genome segments. *Virology* **143**, 309-20.
- Gonzalez, S. A. & Burrone, O. R. (1991). Rotavirus NS26 is modified by addition of single O-linked residues of N-acetylglucosamine. *Virology* **182**, 8-16.
- 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**, 567-76.
- Hundley, F., Biryahwaho, B., Gow, M. & Desselberger, U. (1985). Genome rearrangements of bovine rotavirus after serial passage at high multiplicity of infection. *Virology* **143**, 88-103.
- Imai, M., Akatani, K., Ikegami, N. & Furuichi, Y. (1983). Capped and conserved terminal structures in human rotavirus double-stranded RNA segments. *Journal of Virology* **47**, 125-136.
- Isa, P., Lopez, S., Segovia, S. & Arias, C. F. (1997) Functional and structural analysis of the sialic acid-binding domain of rotaviruses. *Journal of Virology* **71**, 6749-6756.
- Johnson, M. A. & McCrae, M. A. (1989). Molecular biology of rotaviruses VIII. Quantitative analysis of regulation of gene expression during virus replication. *Journal of Virology* **63**, 2048-2055.
- Kabcenell, A. K. & Atkinson, P. H. (1985). Processing of the rough endoplasmic reticulum membrane glycoproteins of rotavirus SA11. *J Cell Biol* **101**, 1270-80.
- Kabcenell, A. K., Poruchynsky, M. S., Bellamy, A. R., Greenberg, H. B. & Atkinson, P. H. (1988). Two forms of VP7 are involved in assembly of SA11 rotavirus in endoplasmic reticulum. *J Virol* **62**, 2929-41.
- Kapikian, A. Z. & Chanock, R. M. (1990). Rotaviruses. In *Virology*, pp. 1353-1373. Edited by B. N. F. D. M. Knipe. 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**, 803-13.

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.

Keegan, L., Gill, G. & Ptashne, M. (1986). Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein. *Science* **231**, 699-704.

Keljo, D. J. & Smith, A. K. (1988). Characterization of binding of simian rotavirus SA-11 to cultured epithelial cells. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **7**, 249-56.

Lawton, J. A., Estes, M. K. & Venkataram Prasad, B. V. (1997). Three dimensional visualization of mRNA release from actively transcribing rotavirus particles. *Nature Structural Biology* **4**, 118-121.

Liu, M., Offit, P. A. & Estes, M. K. (1988). Identification of the simian rotavirus SA11 genome segment 3 product. *Virology* **163**, 26-32.

Lizano, M., Lopez, S. & Arias, C. F. (1991). The amino-terminal half of rotavirus SA114fM VP4 protein contains a hemagglutination domain and primes for neutralizing antibodies to the virus. *J Virol* **65**, 1383-91.

Ludert, J. E., Feng, N., Yu, J. H., Broome, R. L., Hoshino, Y. & Greenberg, H. B. (1996). Genetic mapping indicates that VP4 is the rotavirus cell attachment protein in vitro and in vivo. *J Virol* **70**, 487-93.

Ma, J. & Ptashne, M. (1987). A new class of yeast transcriptional activators. *Cell* **51**, 113-119.

Mackow, E. R., Barnett, J. W., Chan, H. & Greenberg, H. B. (1989). The rhesus rotavirus outer capsid protein VP4 functions as a hemagglutinin and is antigenically conserved when expressed by a baculovirus recombinant. *J Virol* **63**, 1661-8.

Magnusson, G. & Blackhall, J. (1997) Expression and activity of rotavirus NSP5 protein in infected and transfected cells. VI International Symposium on Double Stranded RNA Viruses. Cocoyoc, Mor., México

Mattion, N. M., Cohen, J., Aponte, C. & Estes, M. K. (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. Z. Kapikian. New York: Marcel Dekker Inc.

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.

McCrae, M. A. & Faulkner, V. G. (1981). Molecular biology of rotaviruses. I. Characterization of basic growth parameters and pattern of macromolecular synthesis. *J Virol* **39**, 490-6.

McCrae, M. A. & McCorquodale, J. G. (1983). Molecular biology of rotaviruses. V. Terminal structure of viral RNA species. *Virology* **126**, 204-212.



- Mendez, E., Arias, C. F. & Lopez, S. (1996). Interactions between the two surface proteins of rotavirus may alter the receptor-binding specificity of the virus. *J Virol* **70**, 1218-22.
- Mitchell, D. B. & Both, G. W. (1990). Conservation of a potential metal binding motif despite extensive sequence diversity in the rotavirus nonstructural protein NS53. *Virology* **174**, 618-21.
- Okada, Y., Richardson, M. A., Ikegami, N., Nomoto, A. & Furuichi, Y. (1984). Nucleotide sequence of human rotavirus genome segment 10, an RNA encoding a glycosylated virus protein. *Journal of Virology* **51**, 856-859.
- Patton, J. T. (1986). Synthesis of simian rotavirus SA11 double-stranded RNA in a cell-free system. *Virus Research* **6**, 217-33.
- Patton, J. T. (1990). Evidence of equimolar synthesis of double-strand RNA and minus-strand RNA in rotavirus-infected cells. *Virus Research* **17**, 199-208.
- Patton, J. T. (1995). Structure and function of the rotavirus RNA-binding proteins. *Journal of General Virology* **76**, 2633-44.
- 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. & Gallegos, C. O. (1988). Structure and protein composition of the rotavirus replicase particle. *Virology* **166**, 358-65.
- Patton, J. T. & Gallegos, C. O. (1990). Rotavirus RNA replication: single-stranded RNA extends from the replicase particle. *Journal of General Virology* .
- Patton, J. T., Salter, C. L., Kalbach, A., Mansell, E. A. & Kattoura, M. (1993). Nucleotide and amino acid sequence analysis of the rotavirus nonstructural RNA-binding protein NS35. *Virology* **192**, 438-46.
- Patton, J. T., Jones, M., & Chen, D. (1997) Mechanism of rotavirus RNA replication. VI International Symposium on Double Stranded RNA Viruses.Cocoyoc, Mor., México
- Petrie, B. L., Graham, D. Y. & Estes, M. K. (1981). Identification of rotavirus particle types. *Intervirology* **16**, 20-8.
- Piron, M. & Poncet, D. (1997). Domain of rotavirus NSP3 that interacts with eIF4G. VI International Symposium on Double Stranded RNA Viruses.Cocoyoc, Mor., México
- Piron, M. & Poncet, D. (1997). RNA binding and dimerization of rotavirus NSP3. VI International Symposium on Double Stranded RNA Viruses.Cocoyoc, Mor., México
- 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**, 3159-65.
- Poncet, D., Laurent, S. & Cohen, J. (1994). Four nucleotides are the minimal requirement for RNA recognition by rotavirus non-structural protein NSP3. *EMBO Journal* **13**, 4165-73.

- Poncet, D., Vende, P., Piron, M. & Cohen, J. (1997). Interaction of rotavirus NSP3 with the translation initiation factor eIF4G. VI International Symposium on Double Stranded RNA Viruses. Cocoyoc, Mor., México
- Prasad, B. V. & Chiu, W. (1994). Structure of rotavirus. *Curr Top Microbiol Immunol* **185**, 9-29.
- Prasad, B. V., Wang, G. J., Clerx, J. P. & Chiu, W. (1988). Three-dimensional structure of rotavirus. *J Mol Biol* **199**, 269-75.
- Ramig, R. F. & Petrie, B. L. (1984). Characterization of temperature-sensitive mutants of simian rotavirus SA11: protein synthesis and morphogenesis. *Journal of Virology* **49**, 665-73.
- Ramig, R. F., Wentz, M. J., Barnhart, M. K., Mossel, E., Myers, S. & Zhao, L. (1997) Cis-acting signals involved in replication of rotavirus. VI International Symposium on Double Stranded RNA Viruses. Cocoyoc, Mor., México
- Rao, C. D., Das, M., Ilango, P., Lalwani, R., Rao, B. S. & Gowda, K. (1995). Comparative nucleotide and amino acid sequence analysis of the sequence-specific RNA-binding rotavirus nonstructural protein NSP3. *Virology* **207**, 327-33.
- Sandino, A. M., Jashes, M., Faundez, G. & Spencer, E. (1986). Role of the inner protein capsid on in vitro human rotavirus transcription. *J Virol* **60**, 797-802.
- Shaw, A. L., Rothnagel, R., Zeng, C. Q.-Y., Lawton, J. A., Ramig, R. F., Estes, M. K. & Venkataram Prasad, B. V. (1996). Rotavirus structure: interactions between the structural proteins. In *Viral Gastroenteritis*, pp. 21-27. Edited by S. Chiba, M. K. Estes, S. Nakata & C. H. Calisher. Vienna: Springer-Verlag.
- Stacy-Phipps, S. & Patton, J. T. (1987). Synthesis of plus- and minus-strand RNA in rotavirus-infected cells. *Journal of Virology* **61**, 3479-84.
- Suzuki, H., Kitaoka, S., Sato, T., Konno, T., Iwasaki, Y., Numazaki, Y. & Ishida, N. (1986). Further investigation on the mode of entry of human rotavirus into cells. *Arch Virol* **91**, 135-44.
- Taniguchi, K., Kojima, K. & Urasawa, S. (1996). Nondefective rotavirus mutants with an NSP1 gene which has a deletion of 500 nucleotides, including a cysteine-rich zinc finger motif-encoding region (nucleotides 156 to 248), or which has a nonsense codon at nucleotides 153 to 155. *Journal of Virology* **70**, 4125-4130.
- Tian, Y., Tarlow, O., Ballard, A., Desselberger, U. & McCrae, M. A. (1993). Genomic concatemerization/deletion in rotaviruses: a new mechanism for generating rapid genetic change of potential epidemiological importance. *Journal of Virology* **67**, 6625-6632.
- Venkataram Prasad, B. 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.
- Weclewicz, K., Kristensson, K. & Svensson, L. (1994). Rotavirus causes selective vimentin reorganization in monkey kidney CV-1 cells. *Journal of General Virology* **75**, 3267-3271.

Welch, S.-K. W., Crawford, S. E. & Estes, M. K. (1989). Rotavirus SA11 genome segment 11 protein is a non-structural phosphoprotein. *Journal of Virology* **63**, 3974-3982.

Wentz, M. J., Patton, J. T. & Ramig, R. F. (1996a). The 3'-terminal consensus sequence of rotavirus mRNA is the minimal promoter of negative-strand RNA synthesis. *Journal of Virology* **70**, 7833-7841.

Wentz, M. J., Zeng, C. Q.-Y., Patton, J. T., Estes, M. K. & Ramig, R. F. (1996b). Identification of the minimal replicase and the minimal promoter of (-)-strand synthesis, functional in rotavirus RNA replication *in vitro*. In *Viral Gastroenteritis*, pp. 59-67. Edited by S. Chiba, M. K. Estes, S. Nakata & C. H. Calisher. Viena: Springer-Verlag.

Xu, L., Tian, Y., Tarlow, O., Harbour, D. & McCrae, M. A. (1994). Molecular biology of rotaviruses. IX. Conservation and divergence in genome segment 5. *Journal of General Virology* **75**, 3413-3421.

Xu, Z., Anzola, J. V., Nalin, C. M. & Nuss, D. L. (1989). The 3'-terminal sequence of a wound tumor virus transcript can influence conformational and functional properties associated with the 5'-terminus. *Virology* **170**, 511-522.

Yolken, R. H., Willoughby, R., Wee, S. B., Miskuff, R. & Vonderfecht, S. (1987). Sialic acid glycoproteins inhibit *in vitro* and *in vivo* replication of rotaviruses. *J Clin Invest* **79**, 148-54.