

## Tesis de Posgrado

# Estudios moleculares del gen 11 de rotavirus

Giambiagi, Susana

2001

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Giambiagi, Susana. (2001). Estudios moleculares del gen 11 de rotavirus. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3391\\_Giambiagi.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3391_Giambiagi.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Giambiagi, Susana. "Estudios moleculares del gen 11 de rotavirus". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2001.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3391\\_Giambiagi.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3391_Giambiagi.pdf)

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**Tema de Tesis**

**ESTUDIOS MOLECULARES DEL GEN 11 DE ROTAVIRUS**

**Autor**

**Susana Giambiagi**

**Director de Tesis**

**Dr. Oscar Burrone**

**Codirector de Tesis**

**Dr. Alberto C. Frasch**

**Lugar de Trabajo**

**Instituto de Investigaciones Bioquímicas-Fundación Campomar  
International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology  
ICGEB (Italia)**

**Tesis presentada para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas**

**Año 2001**

3 3 1  
- -

## *AGRADECIMIENTOS*

A mi director, Dr Oscar Burrone por haberme dado la posibilidad de iniciarme en la biología molecular y en la virología y por haberme dirigido en mi trabajo de Tesis, y sobretodo por transmitirme su entusiasmo y haberme tenido siempre tanta paciencia.

A mi co-director, Dr A.C.Frasch por las correcciones de la Tesis, y al Dr R.Ugalde por el apoyo y el impulso recibido en las últimas etapas de la escritura de la tesis.

Al Instituto de Investigaciones Bioquímicas (Fundación Campomar) y al ICGEB (Trieste), por haberme dado la posibilidad de realizar mi trabajo de Tesis.

A todos mis compañeros del IIB, por haberme ayudado en los primeros años.

A Ileana por el trabajo compartido en el ICGEB, por las alegrías y tristezas que nos dieron los rotavirus durante esos años. A Sun y Ivka, compañeros de rotavirus. A Sabrina, por su apoyo en cultivo y por todos los años compartidos. A todos mis compañeros del ICGEB.

A Eduardo por todo su apoyo y enriquecedoras discusiones.

A Facundo, por haberme dado soporte afectivo y consejos. A mis amigas Fabiolina y Giulia por su cariño y momentos compartidos. A Maurizio por el soporte en computación y afectivo.

A todos mis compañeros y amigos del CEVAN y del Instituto de Investigaciones Biotecnológicas (IIB-UNSAM).

A mis padres y hermanos. A todos mis amigos.

## ABREVIATURAS

A:	adenina
Å:	amstrong
aa:	aminoácido
ADN:	ácido desoxirribonucleico
ADNc:	ADN copia
ARN:	ácido ribonucleico
ARNm:	ARN mensajero
C:	citosina
cadena+:	cadena codificante
CAP:	7-metilguanosina (5') trifosfato
CAT:	cloranfenicol acetil-transferasa
cpm:	cuentas por minuto
dc:	doble cadena
DNasa:	desoxirribonucleasa
dNTP:	desoxirribonucleótidos 5'trifosfato
EDTA:	etilen diamino tetraacetato de sodio
EGTA:	etilen glicol-bis ( $\beta$ -aminoetil eter)- tetraacetato de sodio.
G:	guanina
g:	aceleración de la gravedad (980 cm/seg)
IPTG:	isopropil-tiogalactósido
kb:	mil bases
kDa:	mil Daltons
m.o.i.:	multiplicidad de infección
MEM:	medio esencial mínimo
min:	minuto
nm:	nanómetro
nt:	nucleótido
pb:	par de bases
PBS:	buffer fosfato salino
PCR:	reacción en cadena de la polimerasa
PFU:	unidades formadoras de placa
PM:	peso molecular
RE:	retículo endoplásmico
RER:	retículo endoplásmico rugoso

RT: transcriptasa reversa  
SAM:  
sc: simple cadena  
SDS: dodecil sulfato de sodio  
t<sub>1/2</sub>: tiempo medio  
T: timina  
t: tiempo  
UV: ultravioleta

# INDICE

	Pág.
<b>RESUMEN</b>	
<b>INTRODUCCION</b>	
<b>1 Generalidades</b>	2
<b>2 Característica de los virus</b>	
2.1- Morfología	3
2.2- Propiedades Físico-Químicas	4
2.3- Estructura del Genoma Viral	4
2.4- Proteínas Virales	5
2.4.1- Proteínas Estructurales: <i>Core, Cápside Media, Cápside externa.</i>	7
2.4.2- Proteínas No Estructurales	13
2.5- Determinantes Antigénicos	20
2.5.1- Serogrupo	
2.5.2- Serotipo	
<b>3 Ciclo de Replicación Viral</b>	
3.1- Etapa Inicial	23
3.2- Transcripción	26
3.3- Replicación	27
3.4- Ensamblado	28
<b>4 Mecanismos de Variación y Evolución en Rotavirus.</b>	
4.1- Fidelidad de la Polimerasa Viral	29
4.2- Intercambio de Segmentos	30
4.3- Reordenamiento Genómico	30
4.4- Virus Recombinantes	33
<b>5 Biología de los Rotavirus</b>	
5.1- Patología	39
5.2- Epidemiología	40
5.3- Inmunidad a Infecciones por Rotavirus	40
5.4- Desarrollo de Vacunas	41
<b>CAPITULO I: REORDENAMIENTOS GENOMICOS EN ROTAVIRUS</b>	
<b>HUMANOS</b>	
<i>Objetivos</i>	46
<i>Resultados</i>	
1- Origen de los Virus	48

2- Determinación de la estructura molecular del segmento 11 en Rotavirus Humanos de electroferotipo corto	49
3- Homología de la secuencia del segmento 11 reordenado con distintos Rotavirus Humanos	53
4- Proteína NSP5 codificada por segmentos 11 normales y segmentos 11 reordenados	59
<i>Discusión</i>	61
<i>Conclusiones</i>	69

## **CAPITULO II: ESTUDIO DE LAS SECUENCIAS DE RECONOCIMIENTO DE LA POLIMERASA VIRAL EN ROTAVIRUS**

<i>Objetivos</i>	71
<i>Introducción</i>	73
<i>Resultados</i>	
1- Diseño y construcción de ARNs análogos del segmento 11 de rotavirus	76
2- Incorporación al ciclo repliativo viral de ARNs análogos del segmento 11	82
3- Estudio de la región 5' y 3' no codificante del ARN cadena+ viral: Secuencia promotora de la actividad replicasa de la ARN polimerasa viral	90
4- Replicación del ARN exógeno: Detección del ARN sintetizado <i>in vivo</i>	101
5- Desarrollo de un sistema de complementación: Línea celular MA104/NSP	108
6- Empaquetamiento del segmento de ARN exógeno: Búsqueda de partículas virales recombinantes	116
<i>Discusión</i>	121
<i>Conclusiones</i>	132

## **MATERIALES Y METODOS**

## **BIBLIOGRAFIA**



## FIGURAS y TABLAS

	Pág.
<b>Figura 1:</b> Esquema del ciclo replicativo de los rotavirus	24
<b>Figura 2:</b> Perfil electroforético de los rotavirus humanos de electroferotipo corto	50
<b>Figura 3:</b> Oligonucleótidos utilizados en el clonado y secuenciación del segmento 11	52
<b>Figura 4:</b> Secuencia completa del segmento 11 rearrreglado de v252	54
<b>Figura 5:</b> Representación esquemática de la estructura del segmento 11 rearrreglado de los rotavirus humanos analizados	55
<b>Figura 6:</b> Comparación de la inserción en el segmento 11 de los virus v252 y 69M	58
<b>Figura 7:</b> Comparación de la región variable de NSP5 en las distintas cepas de rotavirus grupo A	60
<b>Figura 8:</b> Representación esquemática del plásmido pT3Ro11/CAT+	78
<b>Figura 9:</b> Representación esquemática del plásmido pSP6Ro11/CAT-	80
<b>Figura 10:</b> Esquema del ensayo de infección-transfección	83
<b>Figura 11:</b> Amplificación del ARN Ro11/CAT transfectado en células infectadas por Rotavirus	84
<b>Figura 12:</b> Comparación de la secuencia de las regiones 5' y 3' no codificantes del segmento 11 de distintas cepas de Rotavirus tipo A	86
<b>Figura 13:</b> Complementación de la amplificación de CAT por distintas cepas de Rotavirus tipo A	88
<b>Figura 14:</b> Tratamiento con DNasa del producto de transcripción y transfección	89
<b>Figura 15:</b> Representación esquemática de distintos ARN Ro11/CAT+ con mutaciones en el extremo 3' y 5'	92
<b>Figura 16:</b> Traducción "in vitro" de distintos ARN análogos del segmento 11	93
<b>Figura 17:</b> Amplificación de ARNs/CAT análogos del segmento 11 mutados	95
<b>Figura 18:</b> Efecto de Actinomicina D en la amplificación del ARN Ro11/CAT+	99
<b>Figura 19:</b> Esquema y localización de los oligonucleótidos usados en la transcripción reversa y PCR	102
<b>Figura 20:</b> Productos de RT/PCR	104
<b>Figura 21:</b> Análisis del ARN Ro11/CAT+ sintetizado intracelularmente por ensayo de "primer extension"	107
<b>Figura 22:</b> Esquema de los plásmidos pKG4/11 y pRSV/TK-Neo/11	110
<b>Figura 23:</b> Northern Blot: clones MA104/NSP5	111
<b>Figura 24:</b> Western-Blot de extractos citoplasmáticos de clones MA104/NSP5	113
<b>Figura 25:</b> Localización de la proteína NSP5 en el citoplasma de células MA104	

infectadas y células MA104/NSP5	115
<b>Figura 26:</b> Esquema de los ensayos de infección-transfección para producción de virus recombinantes	117
<b>Figura 27:</b> Representación esquemática del plásmido pT7/OSU11(+4). Construcción y ARN transcrito	119
<b>Figura 28:</b> Esquema de la estructura secundaria (stem-loop) del extremo 3' no codificante del ARN cadena+ viral y de los ARNs+ análogos del segmento 11	128
<b>Tabla I:</b> Segmentos genómicos y productos proteicos de Rotavirus (grupo A)	6
<b>Tabla II:</b> Actividad CAT expresada como porcentaje de conversión	94

## **RESUMEN**

### **“Estudios Moleculares del Gen 11 de Rotavirus”**

Los mecanismos de variación y evolución en los rotavirus comprenden no sólo las mutaciones puntuales introducidas por la RNA polimerasa durante la replicación y la reasociación de segmentos virales durante infecciones mixtas, sino también los reordenamientos que se producen dentro de cada segmento genómico. Estos reordenamientos no afectan la estructura conservada de los segmentos genómicos (extremos 5' y 3' conservados), y esta estructura se supone relacionada con la capacidad de replicación y empaquetamiento del genoma viral en nuevas partículas virales.

Con el objetivo de estudiar los mecanismos de reordenamiento genómicos en rotavirus se analizó la estructura molecular del segmento genómico 11 reordenado de distintos rotavirus humanos de "electroferotipo corto", aislados de niños infectados. De acuerdo a los resultados obtenidos, el segmento 11 reordenado de los aislamientos virales analizados tiene una inserción de 148 nucleótidos en la región 3' no traducida del segmento viral. Las secuencias obtenidas de los segmentos 11 de los distintos aislamientos virales analizados fueron altamente homólogas entre sí y con las secuencias de los segmentos 11 de otras dos cepas de rotavirus humanos decriptas previamente: RV5 y DS-1. La inserción no afecta la región codificante del gen 11, ni la secuencia y localización de la región 3' no codificante, común a todos los segmentos 11 de los rotavirus tipo A. La secuencia de la inserción, rica en A y T, no presenta homología con el segmento 11 normal ni con otros segmentos virales. Los resultados obtenidos permitieron identificar y estudiar un nuevo mecanismo de reordenamiento genómico en rotavirus, en el cual no hay una duplicación parcial del segmento genómico.

Un segundo objetivo de la tesis consistió en el desarrollo de un sistema que permita obtener rotavirus recombinantes. Se estudiaron las secuencias requeridas para que un ARN sea reconocido por la maquinaria viral y sea replicado y empaquetado en nuevas partículas virales. Para estudiar las secuencias involucradas en el reconocimiento del ARN viral por la polimerasa viral hemos construido un plásmido recombinante que al ser transcrito produce un ARN que contiene las secuencias 5' y 3' no traducidas del segmento 11 viral, flaqueando la región codificante del gen CAT. Este ARN es amplificado cuando es transfectado en el citoplasma de células infectadas con rotavirus. De acuerdo a los resultados obtenidos, las señales involucradas en el reconocimiento del ARN por la polimerasa viral con actividad replicasa están localizadas en el extremo 3' no codificante. La polimerasa requiere para iniciar la síntesis de la cadena - del segmento 11, no sólo la secuencia consenso 3', común a todos

los segmentos virales, sino también la formación de una estructura de horquilla dejando un extremo 3' libre de 18 nucleótidos que incluyen la secuencia consenso terminal.

Aunque la metodología propuesta ha permitido desarrollar un método valioso para el análisis de las secuencias de RNA capaces de ser reconocidas por el complejo de replicación viral, la misma no resultó satisfactoria para la obtención de partículas virales recombinantes. Es posible que existan otras señales importantes para el empaquetamiento que probablemente se localicen en la región codificante del segmento 11, y por lo tanto que están ausentes en nuestra construcción.

## ***ABSTRACT***

### **"Molecular studies of Rotavirus Gene 11"**

The mechanisms of genome variation and evolution in rotavirus, involve not only the mutations introduced by RNA polymerase during replication and the reassociation of genomic segments during infection, but also the rearrangement of genomic segments. The rearrangements don't modify the conserved structure of the genomic segments (conserved 5' and 3' ends), and this structure is supposed to be related with the replication and packaging of the viral genome.

The first objective of this thesis was to study the genomic rearrangement mechanism in rotavirus. We have studied the molecular structure of the rearranged genomic segment 11 of different virus isolated from infected children. According to the results, the rearranged segments 11 of the viral isolates have an insertion of 148 nt in the 3' untranslated region. The sequences in all 6 isolates were highly conserved among them, and with those of human strains DS-1 and RV5. The insertion does neither affect the gene 11 coding region nor the sequence and localization of the 3' non coding region, conserved in all the 11 segments of rotavirus group A. The sequence of the insertion, A + T rich, has no clear resemblance with the normal gene 11 sequence nor with other viral segments. The results obtained have allowed identifying and studying a new mechanism of genomic rearrangement in rotavirus, in which partial duplication of genomic segment is not involved.

The second objective was to develop a system for obtaining recombinant rotaviruses. We have developed an assay to study the RNA cis-acting signals that promote the synthesis of dsRNA. We have constructed a recombinant plasmid that transcribed with T3 polymerase yields a positive sense RNA containing the rotavirus gene 11 5' and 3' untranslated regions, flanking the coding region of CAT reporter gene. This RNA is amplified when transfected into the cytoplasm of rotavirus infected cells. The results obtained in the study of 3' mutant RNAs have shown that the cis-acting signals to promote the synthesis of dsRNA involved, not only the 3' consensus sequence, but also a "stem-loop" structure and a single strand 3' end of 18 nt that include the 3' conserved termini. We couldn't obtain recombinant rotavirus using this methodology. It is possible that the packaging signals are not located in the 5' or 3' untranslated region of segment 11, but into the coding region, absent in the RNAs we have studied.

# INTRODUCCION

## 1. Generalidades

Los rotavirus son reconocidos actualmente y ya desde hace muchos años como los principales agentes causales de gastroenteritis aguda en niños y animales jóvenes de numerosas especies de mamíferos y aves. Se estima que ocurren anualmente en todo el mundo 140 millones de casos de infecciones por rotavirus en niños, provocando al menos 1 millón de muertes causadas por diarrea y deshidratación (LeBaron *et al.*, 1990). Las epidemias de rotavirus en animales, principalmente en terneros, cerdos, pavos y pollos, son también causa de grandes pérdidas económicas.

Los rotavirus fueron inicialmente caracterizados como agentes asociados a gastroenteritis en animales. En 1973, Bishop y col. (Bishop *et al.*, 1973), identificaron por microscopía electrónica de biopsias duodenales, los rotavirus humanos: virus de 70nm asociados con diarrea severa en niños.

La importancia clínica y económica de los rotavirus estimuló la investigación básica de estos agentes. Desde 1973, a través de estudios bioquímicos, biológicos y moleculares, y de las propiedades antigénicas de estos virus, se ha ido acumulando información sobre la estructura del virus y su ciclo lítico replicativo. Las investigaciones hoy están enfocadas en la comprensión en detalle de los mecanismos de acción de genes y proteínas de los rotavirus en cada etapa del ciclo replicativo, incluyendo la interacción de las proteínas en la replicación y formación de partículas infectivas, y su interacción con el sistema inmune de individuos infectados. El objetivo de estos estudios es aportar datos que ayuden el desarrollo de nuevos y efectivos métodos de prevención y tratamiento de estas infecciones. Los rotavirus comprenden un género dentro de la familia Reoviridae, dentro de la cual se encuentran clasificados otros 5 géneros. Tres de los géneros: Rotavirus, Reovirus y Orbivirus, comprenden virus que infectan animales, incluyendo humanos. Los tres géneros restantes: Cypovirus, Phytoreovirus y Fijivirus, infectan plantas e insectos. Todos estos virus se encuentran clasificados en una misma familia porque tienen características estructurales similares, el mismo tipo y composición de ácido nucleico, y estrategias replicativas similares.

## 2. Características del virus

### 2.1. Morfología

Los rotavirus son virus icosaédricos de aproximadamente 750-1000 Å de diámetro, sin envoltura. Clásicamente fueron descriptos como virus con una doble cubierta proteica: una cubierta externa compuesta por dos proteínas estructurales: VP4 y VP7 y una cubierta interna compuesta por la proteína estructural más abundante: VP6, que rodea al core. El core está compuesto predominantemente por VP2 con pequeñas cantidades de VP1 y VP3, y contiene el genoma compuesto por 11 segmentos de ARN doble cadena (Estes and Cohen, 1989). Actualmente, en base al perfil de densidad radial obtenido por estudios de la estructura tridimensional del virus (Prasad and Chiu, 1993), se considera que la proteína VP2 constituye una tercer cubierta. La existencia de esta cubierta interna de VP2 fue también sustentada por el hecho que la proteína VP2 expresada en baculovirus se auto-ensambla formando partículas con un radio de 265 Å (Labbé *et al.*, 1991).

Las partículas completas de rotavirus tienen un diámetro de aproximadamente 765 Å. Se denominan "lisas" ya que el margen de la cubierta externa tiene una apariencia lisa y circular bien definida. A partir de la superficie externa lisa de VP7 se proyectan 60 espinas (*spikes*) formadas por dímeros de VP4.

Las partículas de doble cubierta proteica (previamente llamadas de "simple cubierta") miden aproximadamente 705 Å de diámetro y son denominadas "rugosas", ya que al carecer de la cubierta externa los capsómeros de la cubierta intermedia (trímeros de VP6) se proyectan hacia la periferia dando una apariencia circular rugosa.

Ambas cubiertas concéntricas, externa e intermedia, están perforadas por 132 canales acuosos. Estos canales podrían estar involucrados en la importación de metabolitos requeridos para la síntesis de ARNm y en la exportación de los ARNm nacientes.

La tercer cubierta (cubierta interna) formada por VP2 se encuentra a un radio de 265 Å, y encierra el genoma viral y las proteínas virales VP1 y VP3.



## 2.2. Propiedades físico-químicas

Las partículas virales completas ("lisas") tienen una densidad de  $1.36 \text{ g/cm}^3$  y pueden ser separadas, por centrifugación en gradientes de ClCs, de las partículas sin cubierta externa ("rugosas") con densidad de  $1.38 \text{ g/cm}^3$ . Las partículas vacías, visualizadas al microscopio electrónico por tinción negativa, tienen una densidad de 1.29- $1.30 \text{ g/cm}^3$ .

La infectividad de los rotavirus está asociada a la presencia de la cubierta externa, por lo tanto, el tratamiento de las partículas virales con agentes quelantes de  $\text{Ca}^{2+}$  (EDTA o EGTA), que remueven la cubierta externa, resultan en una pérdida de infectividad.

La infectividad de los rotavirus es, en general, bastante estable a la inactivación. Los rotavirus retienen su infectividad a pH entre 3 y 9, pero las exposiciones a pH menor que 3 inactiva al virus rápidamente. La inactivación de los rotavirus a pH ácido es una característica importante a tener en consideración en el desarrollo de vacunas con virus vivo, ya que el pH del estómago se encuentra entre 1.8 y 2.

## 2.3. Estructura del genoma viral

El genoma de los rotavirus se encuentra contenido dentro del core viral. Está constituido por 11 segmentos de ARN doble cadena (dc), con un rango de tamaños de 667 pb (segmento 11) a 3302 pb (segmento 1), con un total de 18.522 pb en todo el genoma.

Los estudios hidrodinámicos de la flexibilidad de cada segmento de ARN en solución indican que para que estos segmentos de ARN dc puedan ser empaquetados en la cápside viral es necesaria la interacción íntima del ARN con proteínas virales (McIntyre *et al.*, 1987).

El análisis de las secuencias nucleotídicas de los segmentos genómicos en distintas cepas de rotavirus reveló la existencia de características que son comunes a todos los segmentos genómicos y otras específicas de cada segmento en particular. En la Tabla N°1 se señalan las características principales de cada segmento. Todos los segmentos genómicos inician con una 5'-guanidina seguida por una secuencia conservada y terminan con una secuencia consenso en el extremo 3' no codificante. Las secuencias consenso terminales, comunes a

todos los segmentos virales, son: **5'GGC(A/U) (A/U)U(A/U)A(A/U)(A/U)** en el extremo 5', y **U(G/U)(U/G)(G/U)(A/G)CC3'** en el extremo 3'. Estas secuencias consenso se encuentran incluidas en las regiones 5' y 3' no codificantes de todos los segmentos genómicos. Las regiones 5' y 3' no traducidas varían en largo y en secuencia nucleotídica entre los distintos segmentos (5' de 9 a 135 nt, 3' de 17 a 185 nt), pero son altamente conservadas para un segmento dado entre distintas cepas pertenecientes al mismo grupo (Estes and Cohen, 1989) (Imai *et al.*, 1983). Estas secuencias terminales consenso y las regiones no codificantes, específicas de cada segmento, podrían contener señales importantes para transcripción, replicación y ensamblado de los segmentos genómicos.

Los genes de rotavirus son fundamentalmente monocistrónicos, con excepción del segmento 9 (Chan *et al.*, 1986) y del 11 (Mattion *et al.*, 1991). En otros genes existe más de un marco de lectura abierto, en fase o no con el marco de lectura principal, pero la existencia de las proteínas potencialmente codificadas no ha sido verificada.

La cadena + del ARN dc genómico posee en su extremo 5' la estructura CAP,  $m^7GpppG^mPy$  (Imai *et al.*, 1983). No existe un uso predominante de un codón de terminación de la traducción en particular y no existe cola de poli (A) en el extremo 3' de los ARNm. Todas las secuencias del genoma de rotavirus son ricas en A+T (58-67%).

El ARN genómico de los rotavirus no es infeccioso, lo cual se corresponde con las características de su ciclo replicativo.

#### **2.4. Proteínas virales**

La asignación de las distintas proteínas virales a los genes correspondientes y la función de algunas proteínas ha sido relativamente bien establecida mediante estudios de traducción *in vitro* del ARNm o del ARN dc desnaturalizado, y por análisis de virus "reasociados" (intercambio de segmentos genómicos entre cepas) (Tabla N°1).

Tabla Nº1: Segmentos genómicos y productos proteicos de Rotavirus (grupo A)

Segmento genómico	Número de pares de bases	Largo de las secuencias no codificantes 5' 3'	Producto proteico	Producto primario Peso molecular kDa (número aminoácidos)	Proteína madura	% en el virión	Localización y características principales.
1	3302	18	VP1	125 kDa (1088)		2.0%	subcore (E) actividad polimerasa
2	2690	16	VP2	102 kDa (880)	miristilada	15.0%	core (E) afinidad por ARN sc y dc. Leucine-zipper.
3	2591	49	VP3	98 kDa (835)		0.5%	subcore (E) guanidiltransferasa
4	2362	9	VP4	86.8 kDa (776)	proteólisis: VP5* (529) VP8* (247)	1.5%	cápside externa (E). Dímero hemoaglutinina, epítopo de neutralización, serotipos P
5	1611	30	NSP1	58.6 kDa (495)			asociada al citoesqueleto (NE) Afinidad al extremo 5' del ARNm viral Dedos de Zn
6	1356	23	VP6	44.8 kDa (397)	miristilada	51.0%	Cápside interna (E). Trímero epítopos de grupo y subgrupo
7	1104	25	NSP3	34.6 kDa (315)			asociada al citoesqueleto (NE) Afinidad al extremo 3' del ARNm viral oligómero
8	1059	46	NSP2	36.7 kDa (317)			acumulación en viroplasma (NE) Afinidad a ARN. Oligómero
9	1062	48	VP7 (1) VP7 (2)	37.3 kDa (326) 33.9 kDa (297)	clivada: (276) N-glicosilada (alta manosa)	30.0%	cápside externa (E) epítopos de neutralización, serotipos G
10	751	41	NSP4	20.3 kDa (175)	28-29 kDa N-glicosilada (alta manosa)		Glicoproteína transmembrana del RER (NE) Rol en morfogénesis
11	667	21	NSP5	21.7 kDa (198)	28 kDa Fosforilada O-glicosilada		Acumulación en viroplasma (NE) Afinidad a ARN(?)

E= proteína estructural

NE= proteína no estructural

Los distintos segmentos genómicos de los rotavirus codifican para proteínas estructurales, que forman parte de la partícula viral, y para proteínas no estructurales, que se encuentran en las células infectadas pero no están presentes en el virión maduro.

Las proteínas estructurales se denominan VP, y son numeradas de acuerdo a su peso molecular aparente en gel de poliacrilamida desnaturalizante, VP1, VP2, VP3, VP4 (clivada en VP5\* y VP8\*), VP6 y VP7, siendo VP1 la proteína de mayor peso molecular.

Las proteínas no estructurales se designan NSP y se numeran de 1-5 de acuerdo al orden de migración en gel desnaturalizante (previamente se designaron NS seguido de un número indicando el peso molecular aparente de la proteína).

#### **2.4.1. Proteínas estructurales**

##### ***Proteínas del core***

**VP1** : Codificada por el segmento genómico 1. Es una de las proteínas del subcore, presente en pocas copias (2% de todo el virión) y con un peso molecular de 125kDa en los virus del grupo A y C y de 136kDa en los virus del grupo B (Hu: ADRV).

De acuerdo a la secuencia de aminoácidos la VP1 es una proteína básica, con una carga neta positiva a pH7, y particularmente bien conservada.

La VP1 tiene actividad polimerasa y es un componente de la transcriptasa y replicasa viral. Su actividad polimerasa está sustentada en numerosos trabajos que indican que: 1) Mutantes termosensibles que mapean en el gen 1 (SA11 ts C) presentan fenotipo negativo para síntesis de ARN<sub>dc</sub> y ARN<sub>sc</sub> (Chen *et al.*, 1990). 2) La VP1 es la proteína responsable de la unión de nucleótidos durante la transcripción y provee el sustrato durante la polimerización del ARN (Valenzuela *et al.*, 1991) 3) Todas las secuencias de VP1, provenientes de distintas cepas de rotavirus, comparten los 4 motivos de aminoácidos conservados en las secuencias de todas las ARN polimerasas dependientes de ARN (Poch *et al.*, 1989). 4) La coexpresión de VP1 y VP3 en el sistema de baculovirus evidencia la actividad polimerasa de VP1 (Mattion *et al.*, 1994). 5) La VP1 es un componente de los intermediarios replicativos que tienen actividad de replicasa (Gallegos and Patton, 1989). 6) Los estudios de partículas tipo core expresadas en baculovirus, demostraron que VP2 y

VP1 se ensamblan en la estructura tipo core más simple con actividad replicasa (Patton *et al.*, 1997).

**VP2** : Codificada por el segmento genómico 2, es la proteína mayoritaria del core viral. VP2 forma la cápside interna, de estructura icosaédrica, constituida por 60 dímeros de VP2 (Shaw *et al.*, 1996). La expresión de VP2 en el sistema de baculovirus recombinantes, ha demostrado que esta proteína viral se autoensambla en ausencia de otras proteínas virales, formando partículas vacías que presentan una morfología y tamaño similar a los cores virales (Labbé *et al.*, 1991). Esta cubierta interna rodea a las dos proteínas minoritarias VP1 y VP3, y al genoma de 11 segmentos. La cubierta de VP2 juega un rol importante en la estructura y función del core. VP2 interacciona con los trímeros de VP6 (cubierta intermedia) que rodean a la cubierta interna de VP2 y por otra parte, el extremo amino terminal de VP2 es necesario para la encapsidación de VP1 y VP3 (Zeng *et al.*, 1998). VP2 se une a ARNsc y ARNdc de un modo no específico respecto a la secuencia (Boyle and Holmes, 1986) (Labbé *et al.*, 1991) (Mattion *et al.*, 1992). La región de la VP2 involucrada en la unión a ARNsc y posiblemente ARNdc se localiza en los primeros 132 aminoácidos del extremo amino terminal de la proteína viral que posee dos regiones que presentan repeticiones de leucinas cada 7 aminoácidos (*leucine-zipper*) (Mattion *et al.*, 1994) (Labbé *et al.*, 1994).

Por otra parte, VP2 se encuentra asociada a los viroplasmos en células infectadas y es una de las proteínas integrantes de las partículas subvirales con actividad replicativa (Gallegos and Patton, 1989). Aunque el rol de VP2 en la replicación no ha sido caracterizado, la presencia de VP2 en las partículas subvirales, así como la interacción de VP1 y VP2 en partículas tipo core expresadas en baculovirus, es necesaria para la síntesis de ARNdc *in vitro* (Mansell and Patton, 1990) (Patton *et al.*, 1997).

**VP3** : Codificada por el segmento genómico 3, VP3 es una proteína minoritaria del subcore viral, de 85-90 kDa.

La proteína VP3 tiene actividad de guanidiltransferasa y metiltransferasa y es la proteína responsable de la modificación del extremo 5' del ARNm virales formando una estructura CAP tipo I,  $m^7GpppG^m$ . De acuerdo a experimentos realizados por Fukuhara y col (Fukuhara *et al.*, 1989), VP3 tiene actividad de unión de GTP dependiente de la presencia de cationes divalentes como  $Mg^{+2}$  o  $Mn^{+2}$  como cofactores, característica de las guanidiltransferasas. Esta actividad de unión a GTP ha sido verificada por Pizarro y col en ensayos con partículas virales y subvirales purificadas (Pizarro *et al.*, 1991) y por expresión de VP3 en sistema de baculovirus recombinante (Liu *et al.*, 1992). La actividad guanidiltransferasa de VP3 no es específica y puede transferir la estructura CAP a cualquier ARN sc que inicie con un residuo G o A (Patton and Chen, 1999), sin embargo no modifica la cadena - del ARNdc viral. Estos resultados son consistentes con la afinidad de VP3 por ARN sc (en forma no específica) pero no por ARNdc.

La actividad metilasa de VP3 ha sido detectada en ensayos *in vitro* en presencia de SAM, y en ensayos de *cross-linking* en los que se demostró la unión específica de VP3 a SAM (Chen *et al.*, 1999).

Los bajos niveles de expresión de VP3 tanto en sistema *in vitro* como en el sistema de baculovirus sugiere que existe algún tipo de regulación de su expresión, posiblemente por la estructura secundaria del extremo 5' del ARNm de la proteína VP3 (Liu *et al.*, 1992).

### ***Cápside media***

**VP6** : Codificada por el segmento genómico 6 en rotavirus grupo A y 6 o 5 para los grupos B y C. Es el principal componente estructural de las partículas virales (51%). Es una proteína altamente inmunogénica y es el antígeno primario detectado en la mayor parte de los ensayos de diagnóstico, pero los anticueros desarrollados contra VP6 no son neutralizantes. Contiene epitopes comunes (cross-reactivos), llamados antígenos de grupo, compartidos entre los virus de un mismo grupo. Dentro del grupo A de rotavirus han sido definidos serológicamente otros epitopes en VP6, antígenos de subgrupo, que diferencian dos subgrupos I y II.

VP6 es una proteína miristilada. Es particularmente hidrofóbica en los 3 grupos de rotavirus (A, B y C), y contiene una única región hidrofílica (aa 90-110). Es rica en prolina (5.2%), que se acumulan predominantemente cerca del extremo carboxilo, y contiene 3 (grupo A y C) o 6 (grupo B) cisteínas .

En el virión hay 780 moléculas de VP6. La proteína VP6 forma trímeros que a su vez se agrupan en hexámeros constituyendo la cápside media (Yeager *et al.*, 1990). La formación de trímeros es una propiedad intrínseca de la proteína y el dominio necesario para la trimerización está localizado en la región central de la proteína entre los aminoácidos 105-328 (Clapp and Patton, 1991). La proteína VP6 juega un rol importante en la estructuración del virión debido a su interacción con proteínas de la cápside externa (VP4 y VP7) y con la proteína VP2 de la cápside interna. La coexpresión de VP6 y VP2 en el sistema de baculovirus recombinante resulta en la formación de partículas con estructura similar a las partículas virales de doble cubierta (Labbé *et al.*, 1991). El dominio funcional de VP6 responsable del ensamblado de la proteína en partículas de doble cubierta (interacción con VP2, cápside interna o core) es su porción carboxilo terminal (aminoácidos 251-397) que es altamente conservada en las distintas cepas de rotavirus (Clapp and Patton, 1991). En condiciones apropiadas VP6 se autoensambla *in vitro*, formando partículas esféricas similares a las partículas virales de doble cubierta (Ready and Sabaara, 1987).

Otra característica importante de VP6 es su rol en la interacción de las partículas de doble cubierta con la membrana del R.E., a través de la unión específica a la proteína viral NSP4 que actúa como receptor en la membrana del R.E. (Au *et al.*, 1989) (Meyer *et al.*, 1989).

VP6 es requerida en la transcripción viral, aunque en si misma carece de actividad de polimerasa. La remoción de VP6 de las partículas de doble cubierta proteica resulta en la pérdida de la actividad de transcriptasa y su agregado a partículas de simple cubierta la restituye. Por el contrario, VP6 no es un componente esencial de las partículas replicativas (Mansell and Patton, 1990).

### ***Cápside Externa***

**VP7** : Es la proteína más abundante de la cápside externa y forma la superficie lisa externa de los viriones.

La cápside externa de los rotavirus consiste en 780 moléculas de VP7, dispuestas alrededor de 132 canales acuosos (Yeager *et al.*, 1990).

VP7 es una proteína altamente inmunogénica. Induce principalmente anticuerpos específicos de serotipo, pero también anticuerpos neutralizantes de reacción cruzada. Han sido identificados 14 serotipos distintos de VP7 (serotipo G).

VP7 es la única glicoproteína estructural en los rotavirus. Presenta oligosacáridos de tipo alta manosa modificados por procesamiento en el RE. El número y ubicación de los sitios putativos de glicosilación es variable y esta variación podría ser importante en la modificación de epitopes de neutralización. El número de cisteínas de VP7 varía en los distintos grupos de rotavirus, pero es conservado dentro de cada grupo. La ubicación de las cisteínas predetermina la estructura secundaria de VP7 a través de los posibles puentes disulfuro.

Han sido descritas en VP7 tres regiones altamente conservadas en los tres grupos de rotavirus (grupo A, B y C). 1) La región aminoterminal presenta uno o dos dominios hidrofóbicos conservados que podrían funcionar como péptido señal para dirigir la proteína al RE y que son removidos por clivaje en la proteína madura. VP7 es retenida en el RE y es adquirida por el virión en el proceso de maduración. La región de VP7 indicada como crítica en la retención en el R.E. está comprendida en los primeros 111 aminoácidos de la proteína (Stirzaker and Both, 1989), específicamente se ha indicado como esencial para su retención en el RE a la secuencia de aminoácidos altamente conservada localizada entre los aminoácidos 57 al 63 (Maas and Atkinson, 1994). 2) Existe una región conservada en la parte media de la proteína (aminoácidos 192-231 en el grupo A) que es de particular interés porque corresponde a una de las regiones conocidas por ser importantes en la neutralización para virus del grupo A. 3) El tercer dominio conservado en VP7 está localizado en la porción carboxilo terminal e incluye una serie de aminoácidos que se suponen involucrados en la unión a células.



Existe en la VP7 de los rotavirus grupo A, un sitio putativo de unión al ión  $\text{Ca}^{2+}$  localizado entre los aminoácidos 124 y 155, que no está presente en los rotavirus grupo B y C. La unión a  $\text{Ca}^{2+}$  podría estar relacionada con la estabilidad de la partícula viral, ya que se sabe que la cápside externa se desensambla a bajas concentraciones o en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  produciendo partículas no infectivas.

**VP4** : Es el producto del segmento genómico 4. Es una proteína de 88 kDa, no glicosilada, que forma parte junto con VP7 de la cápside externa de los rotavirus. La VP4 forma 60 proyecciones (*spikes*) que se extienden al menos 100 Å sobre la superficie lisa de la cubierta proteica externa formada por VP7 (Yeager *et al.*, 1990). Estas proyecciones son estructuras diméricas de VP4 (Prasad *et al.*, 1990) (Yeager *et al.*, 1990) (Shaw *et al.*, 1993) compuestas por una cabeza bilobulada y una base globular con simetría hexamérica. La base globular de VP4 penetra hasta radios correspondientes a la superficie de la cubierta media, formada por trímeros de VP6 (Shaw *et al.*, 1993) (Yeager *et al.*, 1994). La infectividad de los rotavirus está incrementada por el clivaje proteolítico de VP4 en VP5\* (~60 kDa) y VP8\* (~28kDa) (Espejo *et al.*, 1981) (Estes *et al.*, 1981), y está involucrada con la interacción temprana del virus con la célula (Ludert *et al.*, 1996) (Arias *et al.*, 1996).

La proteína VP4 está implicada en diversos roles durante la infección de los rotavirus: es capaz de aglutinar eritrocitos (hemoaglutinación); es un determinante de virulencia y está relacionada con la restricción del crecimiento de ciertos rotavirus en cultivo de tejido; y con la adsorción a células y penetración. VP4 podría también desempeñar un rol en la maduración de la progenie viral por interacción con NSP4.

Los dímeros de VP4 tienen actividad de hemoaglutinina, y específicamente esta actividad mapea en una región de VP8\* (Fiore *et al.*, 1991). La estructura dimérica de la hemoaglutinina de los rotavirus no es sorprendente ya que diversas hemoaglutininas virales funcionan como estructuras multiméricas (reovirus, coronavirus, influenza). VP8\* también está involucrada en la unión de los rotavirus a residuos de ácido siálico en la superficie celular (Isa *et al.*, 1997).

La VP4 induce anticuerpos neutralizantes, algunos de los cuales están involucrados en inmunidad heterotípica y protección cruzada.

#### **2.4.2. Proteínas No Estructurales**

**NSP1 (NS53):** Codificada por el segmento genómico 5. Es una proteína de 491 aminoácidos, con carga neta positiva a pH7.

Es una proteína pobremente conservada entre los rotavirus del grupo A, especialmente en su región carboxilo terminal. Existe una homología de solo un 36% en la secuencia aminoacídica de NSP1 entre distintos serotipos de rotavirus (Hua *et al.*, 1993). A pesar de la gran divergencia de NSP1 en los distintos rotavirus, la porción aminoterminal presenta una región rica en cisteínas con un motivo altamente conservado que podría dar lugar a la formación de una o dos estructuras en dedos de Zn (*Zn finger*). Consistente con la presencia de esta estructura, la proteína presenta afinidad por Zn (Brottier *et al.*, 1992). La NSP1 presenta afinidad específica por los extremos 5' de los ARNm virales (Hua *et al.*, 1994). El dominio de unión a ARN ha sido mapeado en los primeros 81 aminoácidos de NSP1, región que incluye los putativos dedos de Zn.

No ha sido descripta ninguna función viral relacionada con el extremo carboxilo de NSP1, y ha sido demostrado que esta región no es esencial para la replicación viral en células en cultivo (Hua and Patton, 1994).

La proteína NSP1 se encuentra asociada al citoesqueleto de células infectadas y forma parte de los intermediarios tempranos de replicación (Gallegos and Patton, 1989).

En células infectadas la NSP1 se detecta predominantemente a tiempos tempranos de la infección y se expresa en niveles muy bajos. Toda la región 5' no codificante y los primeros 55 nucleótidos del gen son altamente conservados. Al igual que en NSP2, esta región puede formar una estructura secundaria de *stem-loop* que involucra al codón de iniciación, que podría estar relacionada con la regulación de la traducción (Hua *et al.*, 1993).

**NSP2 (NS35):** Es una proteína muy conservada dentro de los rotavirus grupo A, codificada por el segmento 8 (cepa SA11). La NSP2 es una proteína muy básica, de 317 aminoácidos, que se encuentra en alta concentración en células infectadas.

NSP2 presenta afinidad a ARN, tanto doble cadena como simple cadena (Patton *et al.*, 1993), en forma no específica de la secuencia. Por ensayos de *cross-linking* se ha demostrado que se encuentra asociada a ARN *in vivo* (Kattoura *et al.*, 1992). La región de la proteína NSP2 comprendida entre los aminoácidos 205 y 241, altamente conservada en las distintas cepas de rotavirus y extremadamente básica, ha sido postulada como el dominio de unión a ARN (Patton *et al.*, 1993) La proteína NSP2 forma multímeros de 6 a 8 copias y su afinidad por el ARN podría ser dependiente de su multimerización (Patton, 1995) (Patton *et al.*, 1999).

La proteína NSP2 se localiza en los viroplasmos (inclusiones citoplasmáticas que forma el virus durante la replicación y el ensamblado) y ha sido detectada en partículas subvirales con actividad de replicasa, junto con NSP3, NSP5 y NSP1 (Gallegos and Patton, 1989) Su localización y el hecho que mutantes termosensibles (SA11 ts E) del gen que codifica para NSP2 (segmento 8) presentan fenotipo negativo para la síntesis de ARNsc y dc (Chen *et al.*, 1990) indican que la proteína NSP2 es esencial para la replicación viral. Se ha propuesto que la proteína NSP2 podría actuar concentrando ARNm viral en los viroplasmos, y que los complejos ARNm-NSP2 podrían servir como sustrato para la replicación.

La comparación de la secuencia nucleotídica del gen correspondiente a la proteína NSP2 en distintas cepas de rotavirus identificó dos regiones de alta homología, una de 75 bases en el extremo 5' y otra de 28 bases en el extremo 3'. La predicción de la estructura secundaria de ARNm de NSP2 sugiere que las regiones conservadas pueden interactuar resultando en 1) apareamiento entre los extremos 5' y 3', y 2) formación de una estructura de *stem-loop* en el extremo 5' que incluye el codón de iniciación de la traducción (Patton *et al.*, 1993). Esta estructura secundaria del ARNm de NSP2, ha sido propuesta como señal de reconocimiento para el empaquetamiento de este ARN o como reguladora de la expresión de NSP2, afectando su frecuencia de traducción.

**NSP3 (NS34):** Es una proteína ácida de 315 aminoácidos que se produce en grandes cantidades en las células infectadas. La NSP3 es sintetizada en estadios temprano de la infección, por lo que se supone podría desempeñar un rol regulatorio en el ciclo viral. Presenta 3 dominios principales: a) una región básica conservada, localizada en la parte media de la proteína, con homología a proteínas de unión a ARNsc (NS2 en orbivirus y  $\sigma$ NS en reovirus), b) una región en la mitad carboxilo terminal, que presenta repeticiones de residuos hidrofóbicos cada 7 aminoácidos (*heptad repeat*), típica de estructuras *coiled-coil* de  $\alpha$ -hélice, normalmente relacionadas con la formación de homo y hetero-oligómeros (Mattion *et al.*, 1992) y c) un motivo cremallera de leucinas (*leucine zipper*) aparentemente con influencia estabilizante de la oligomerización.

La naturaleza oligomérica de NSP3 ha sido demostrada en células MA104 infectadas y por expresión de NSP3 en células de insecto por baculovirus (Mattion *et al.*, 1992).

La NSP3 tiene un rol central en el ensamblado de los 11 ARN cadena+ en los intermediarios replicativos (Poncet *et al.*, 1993) (Gallegos and Patton, 1989) y tiene una localización preferencial asociada al citoesqueleto donde son ensamblados los intermediarios replicativos (Mattion *et al.*, 1992). La proteína NSP3 se ha encontrado asociada a la secuencia consenso del extremo 3' de los ARNm de rotavirus en células infectadas (Poncet *et al.*, 1993). Ha sido propuesto que NSP3 permitiría seleccionar los ARNm virales del total de ARNm de la célula por unión a la secuencia consenso 3', y podría estar involucrada en su transporte desde las partículas de transcripción a los sitios de replicación.

Por otra parte, se ha demostrado que la proteína NSP3 participa en la iniciación de la traducción de los ARNm virales. La NSP3 presenta similitudes con la proteína eucariota de unión a poli A (PABP), y se encuentra asociada al factor eucariota de iniciación de la traducción eIF4G en células infectadas por rotavirus (Piron *et al.*, 1998) (Piron *et al.*, 1999). La unión específica de NSP3 al extremo 3' del ARNm viral y su interacción con el factor de iniciación eIF4GI favorece la traducción eficiente del ARNm viral. La NSP3 interacciona con el factor eIF4GI en la misma región que la proteína PABP. Como consecuencia de esto, durante la infección viral la proteína PABP es desplazada de eIF4GI,

dificultando de este modo la traducción del ARNm celular poliadenilado, provocando probablemente de este modo el bloqueo (*shut-off*) de la traducción celular que se observa durante la infección con rotavirus (Piron *et al.*, 1998).

**NSP4 (NS28)** : Codificada por el segmento 10 en los rotavirus grupo A, la NSP4 es una glicoproteína que se localiza en la membrana del retículo endoplasmático (R.E.) de células infectadas. El producto primario tiene un peso molecular aparente de 20 kDa (175 aa) y la proteína glicosilada de 28 kDa. Hay dos sitios de glicosilación con residuos oligosacáridos alta manosa. La región amino terminal de la NSP4 posee 3 dominios hidrofóbicos (H1, H2:residuos 25-44, H3:residuos 70-80), el primero de los cuales incluye los 2 sitios de glicosilación. Existen distintas hipótesis que presentan a H2 o alternativamente H3 como el dominio transmembrana. La región amino terminal, con sus residuos glicosilados, está orientada hacia el lumen del R.E., y la región carboxilo terminal de NSP4 constituye el dominio citoplasmático. La proteína NSP4 se encuentra predominantemente como forma tetramérica (Maas and Atkinson, 1990), solamente el dominio citoplasmático de NSP4 es necesario para su oligomerización correcta (Taylor *et al.*, 1992).

NSP4 tiene funciones pleiotrópicas en la replicación viral y patogénesis: a) es el receptor intracelular para partículas de doble cubierta citoplasmática, y participa en la traslocación al RER y en la maduración de las partículas virales (morfogénesis viral), b) tiene actividad desestabilizadora de membranas, específica del RE, y c) NSP4 liberada por la lisis celular actúa como una enterotoxina, y está relacionada con la virulencia.

La proteína NSP4 interviene en el proceso de maduración de las partículas virales: actúa como receptor de las partículas virales inmaduras de doble cubierta en la membrana del R.E. (Au *et al.*, 1989) (Meyer *et al.*, 1989), media la traslocación de las partículas inmaduras, que brotan en el R.E. posiblemente mediante la adquisición de una envoltura transiente, y la maduración de estas partículas que implica la remoción de la envoltura y la adquisición de la cubierta externa de VP4 y VP7. La unión de las partículas virales a la membrana de R.E. se produce por interacción específica del dominio carboxilo terminal

citoplasmático de la proteína NSP4 con la proteína de la cápside media VP6 (Au *et al.*, 1989) (Meyer *et al.*, 1989). Ambas proteínas tienen dominios conservados que involucran la interacción receptor-ligando. La porción citoplasmática de NSP4 interacciona también con la proteína estructural VP4 que junto con VP7 formará la cápside externa del virión (Poruchynsky and Atkinson, 1991) (Au *et al.*, 1993). Los dominios involucrados en la unión a partículas de doble cubierta proteica y a VP4 han sido mapeados en la porción carboxilo terminal de NSP4 (Taylor *et al.*, 1992) (Au *et al.*, 1993). La interacción con las partículas citoplasmáticas inmaduras requiere los 16 a 20 aminoácidos terminales de cada subunidad del receptor tetramérico (O'Brien *et al.*, 2000).

La proteína NSP4 localizada en la membrana del R.E. tiene un efecto desestabilizador de membranas que afecta directamente la membrana del R.E. y que provoca cambios en su permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  (Tian *et al.*, 1995)(Tian *et al.*, 1996)(Newton *et al.*, 1997)(Browne *et al.*, 2000). El dominio funcional, responsable de la actividad desestabilizadora, fue atribuido a la región comprendida por los aminoácidos 114 a 135 (Tian *et al.*, 1996), más recientemente, se atribuyó esta función desestabilizadora a los residuos 55 a 72 (Newton *et al.*, 1997), o 48 a 91 (Browne *et al.*, 2000). Esta actividad desestabilizadora de la membrana del R.E. podría estar relacionada con la remoción de la envoltura transiente durante la maduración de las partículas virales, y ha sido propuesto que su actividad podría estar modulada por otras proteínas virales (VP4 y VP7) (Tian *et al.*, 1996).

La proteína NSP4 está relacionada con la patogenia viral. La NSP4 (o el péptido de NSP4 que comprende los aminoácidos 114 a 135) tiene actividad de enterotoxina, y es responsable de la iniciación de la diarrea secretoria inducida por la infección de rotavirus (Ball *et al.*, 1996) (Dong *et al.*, 1997). La proteína NSP4 liberada por lisis celular de las células infectadas, interacciona con receptores en la membrana de células vecinas no infectadas induciendo la movilización del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. El modo de acción exógeno de NSP4 ocurre por una vía distinta que en las células infectadas, en este caso la movilización del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular es un proceso mediado por receptor que involucra activación de la fosfolipasa C (PLC) y producción de inositol trifosfato (IP3) (Dong *et al.*, 1997). El

incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular activa vías secretorias de  $\text{Cl}^-$  (Ball *et al.*, 1996), y promueve la secreción de fluido a través de la mucosa.

**NSP5 (NS26)** : NSP5, el producto proteico más largo del gen 11, es una proteína no estructural, altamente conservada en los rotavirus grupo A, con un alto contenido en serinas y treoninas (24%). Se produce abundantemente en células infectadas y está asociada a los viroplasmos citoplasmáticos en etapas tempranas de la infección, pero su función aún se desconoce.

Se han descrito dos tipos de modificaciones post-traduccionales de la NSP5: 1) fosforilación (Welch *et al.*, 1989), y 2) O-glicosilación (González and Burrone, 1991). El peso molecular (P.M.) de NSP5, calculado de acuerdo a la secuencia del gen, es de 21.7 kDa. En células infectadas la NSP5 se hiperfosforila dando lugar a distintas isoformas con un P.M. aparente de 26 y 28 kDa y una forma más heterogénea de 32-34 kDa (Afrikanova *et al.*, 1996) (Blackhall *et al.*, 1997) (Poncet *et al.*, 1997). Las distintas movilidades de NSP5 están relacionadas con su nivel de fosforilación, ya que el tratamiento con fosfatasa convierte a las distintas isoformas de NSP5 en la forma de 26 kDa, que se encuentra también fosforilada y es resistente a fosfatasas (Afrikanova *et al.*, 1996) (Blackhall *et al.*, 1997). Las isoformas hiperfosforiladas (30-34 kDa) aparecen más tardíamente en la infección, 6 a 8 horas post-infección (Blackhall *et al.*, 1998). Existen fuertes evidencias de que la NSP5 se autofosforila, la proteína inmunoprecipitada de células infectadas presenta actividad quinasa *in vitro* (Afrikanova *et al.*, 1996) (Blackhall *et al.*, 1997) y también se detectó actividad quinasa, aunque en menor grado, en NSP5 expresada en bacterias como proteína de fusión (Blackhall *et al.*, 1997) (Poncet *et al.*, 1997).

Además de ser fosforilada en residuos serina (Blackhall *et al.*, 1997), la NSP5 es O-glicosilada por adición de N-acetilglucosamina a residuos serina o treonina, y esta modificación se encuentra presente en las distintas isoformas de NSP5 en células infectadas, cambiando solo ligeramente su movilidad en PAGE (González and Burrone, 1991). Este tipo de O-glicosilación ocurre solo en algunas proteínas nucleares y

citoplasmáticas y en muchas serin o treonin- fosfoproteínas en las que este tipo de glicosilación está involucrada en regular el grado de glicosilación. La O-glicosilación podría estar relacionada con la regulación del grado de fosforilación de NSP5, ya que las formas más hiperfosforiladas son las que contienen menor proporción de residuos N-acetil glucosamina (Afrikanova *et al.*, 1996).

NSP5 se une a ARNsc y poly (U)-Sepharosa, afinidad que se incrementa en presencia de NSP2 (Mattion *et al.*, 1994). Por otra parte, tiene una región rica en aminoácidos básicos cerca de extremo carboxilo-terminal, y se ha propuesto que podría tener alguna función de unión a ARN.

La proteína NSP5 interacciona *in vivo* con NSP2. Ambas proteínas son co-immunoprecipitadas a partir de extractos de células infectadas, tratados con agentes químicos (cross-linked) o con U.V.. La asociación de NSP5 con NSP2 incrementa su actividad quinasa, y es necesaria para la hiperfosforilación de NSP5 (Afrikanova *et al.*, 1998). Por otra parte, el extremo amino terminal de NSP5 tendría aparentemente una función regulatoria de la fosforilación, ya que su eliminación aumenta la fosforilación de NSP5, mismo en ausencia de NSP2 (Afrikanova *et al.*, 1998). El dominio carboxilo terminal presenta homología con guanido quininasas (Mattion *et al.*, 1994), coincidente con esta característica, la delección de este dominio inhibe la fosforilación de NSP5, mismo en presencia de NSP2 (Afrikanova *et al.*, 1998). Las proteínas NSP2 y NSP5 interaccionan formando estructuras de tipo viroplasma (VLS) en ausencia de otras proteínas virales (Fabbretti *et al.*, 1999).

Existe en varias cepas de rotavirus un segundo marco de lectura fuera de fase (+1), en posición 80 a 359. El polipéptido codificado NSP6, de P.M. aparente de 12 kDa, se observó en células infectadas asociado a los viroplasma y en sistemas de traducción *in vitro* (Mattion *et al.*, 1991). La relevancia de este polipéptido no es conocida, ya que este segundo marco de lectura del segmento 11 no está presente en todos los rotavirus del grupo A, y no se encuentra en el gen homólogo de rotavirus de los grupos B y C.



## 2.5. Determinantes antigénicos

### 2.5.1. Serogrupo

Los rotavirus están clasificados serológicamente en grupos (serogrupos), en base a antígenos de reacción cruzada detectables por una serie de test serológicos como: inmunofluorescencia, ELISA, e inmunomicroscopía electrónica. Han sido identificados en rotavirus 7 serogrupos (A-G) en los que los miembros de cada grupo comparten antígenos comunes distintivos. Los rotavirus miembros del grupo A son causa común de infecciones entéricas tanto en humanos como en animales jóvenes. Los rotavirus no A, son detectados en general menos frecuentemente. Los grupos B y C han sido identificados en humanos y algunas especies de animales, mientras que los grupos D, E, F y G han sido descritos hasta el momento sólo en animales (Bridger, 1987).

#### SEROGRUPO

A	B	C	D	E	F	G
Muchas especies	Cerdos Bovinos Ovejas Humanos	Cerdos Humanos Hurones	Aves (Gallinas, pavos, faisanes)	Cerdos	Aves (Gallinas)	Aves (Gallinas)

Los rotavirus del grupo B han sido asociados con epidemias anuales de diarrea en adultos en China. Los rotavirus del grupo C han sido identificados esporádicamente en materia fecal de niños con diarrea, pero su importancia clínica no es muy clara. La información referente a los rotavirus del grupo no-A es limitada. Muy pocos rotavirus de los grupos no-A han sido adaptados a pasaje seriado en cultivo de células, entre estos una cepa de rotavirus porcino perteneciente al grupo C y algunos rotavirus aviares del grupo D (Saif and Jiang, 1993).

Los rotavirus del grupo A están clasificados en dos subgrupos, I y II. Los rotavirus humanos pertenecen tanto al subgrupo I como II y los rotavirus animales principalmente al subgrupo II. Algunos rotavirus no pertenecen a ninguno de los dos subgrupos, y otros comparten las especificidades de ambos subgrupos.

Los antígenos de grupo y subgrupo están asociados en su mayor parte a epitopes localizados en la proteína de la cápside media VP6 que es altamente inmunogénica. Mediante el uso de anticuerpos monoclonales específicos de grupo han sido definidos en VP6 tres dominios antigénicos involucrados en la especificidad de grupo, sitio I, sitio II y sitio III, localizados en su extremo amino terminal (Kohli *et al.*, 1992). Con respecto a los epitopes de sub-grupo, han sido identificadas en VP6 cinco regiones (A-E), la región A y la región C podrían contribuir a los epitopes del subgrupo I y las regiones B, D y E podrían contribuir a los epitopes del subgrupo II (Gorziglia *et al.*, 1988). Los anticuerpos monoclonales de subgrupo I y II reaccionan únicamente con la forma trimérica de VP6 lo cual indica que la especificidad de los antígenos de subgrupo está determinada por epitopes conformacionales producidos por el plegamiento de VP6 o por interacción entre monómeros de VP6 (Gorziglia *et al.*, 1988).

### **2.5.2. Serotipo**

Dentro de cada serogrupo los rotavirus son clasificados en serotipos, dados por la reactividad del virus en ensayos de neutralización con sueros hiperinmunes. Las proteínas relacionadas con la inducción de anticuerpos neutralizantes son las proteínas de la cápside externa VP7 y VP4. Los serotipos son definidos por la reactividad de anticuerpos neutralizantes con epitopes en la glicoproteína VP7 (serotipo G), o con epitopes en la proteína VP4 (serotipo P, proteína susceptible a proteasa) (Mattion *et al.*, 1994).

En los rotavirus grupo A han sido identificados 14 serotipos diferentes de VP7 (serotipos G) que comprenden rotavirus humanos y animales (Mattion *et al.*, 1994). Han sido también descritos rotavirus que comparten especificidad para más de un serotipo (Nagesha *et al.*, 1990). El análisis de la secuencia de distintos genes que codifican para VP7 indica que la secuencia de aminoácidos de VP7 está muy conservada en rotavirus pertenecientes al mismo serotipo. Por otro lado, han sido identificadas regiones discretas de aminoácidos de alta variabilidad entre serotipos distintos pero muy conservadas dentro del mismo serotipo. Tres de estas regiones variables se correlacionan con los sitios antigénicos descritos previamente por Dyall-Smith y col (Dyall-Smith *et al.*, 1986)

denominados A, B y C. Se sugiere que estos sitios antigénicos son próximos entre sí y son dependientes de la estructura conformacional de VP7 (Green *et al.*, 1992)

Los serotipos de VP4 son difíciles de definir ya que la mayor parte de los anticuerpos en sueros hiperinmunes contra los viriones de rotavirus están dirigidos contra VP7. Existen dos sistemas de clasificación distintos para VP4, uno definido por el análisis de la secuencia (genotipo) (Estes and Cohen, 1989) y otro basado en análisis serológicos (serotipo), ambos sistemas tienen una buena correlación entre sí. El sistema de tipificación serológica de VP4 se basa en ensayos de neutralización con antisueros contra distintas proteínas VP4-recombinantes expresadas en el sistema de baculovirus (Gorziglia *et al.*, 1990) o usando virus reasociados con un particular gen VP4 (Snodgrass *et al.*, 1990). De acuerdo a este sistema han sido identificados 10 serotipos P, que incluyen cuatro serotipos y un subtipo de rotavirus humanos (P1A, P1B, P2, P3 y P4) (Gorziglia *et al.*, 1990) (Qian and Green, 1991) (Serenio and Gorziglia, 1994). Los principales sitios antigénicos responsables de la especificidad de serotipos P están localizados en la subunidad VP8\* de VP4 (Larralde *et al.*, 1991). Han sido identificadas tres subregiones en VP8\* (A, B, C) responsables de la actividad de neutralización. Una sola de ellas, la región B en la parte central de VP8\* (aminoácidos 84-180), contiene epítopes específicos de serotipo (Larralde and Gorziglia, 1992). Aparentemente, la secuenciación de esta región de la proteína VP4 de rotavirus podría permitir la identificación de los distintos serotipos P. Se han descrito por otra parte 21 genotipos diferentes para VP4.

### 3. Ciclo de Replicación Viral

La replicación de los rotavirus ha sido estudiada principalmente en líneas celulares de riñón de mono en cultivo. No existen estudios realizados en líneas de células del intestino, células por las que los rotavirus presentan un tropismo natural, pero los estudios de microscopía electrónica o inmunocitoquímica en biopsias de intestino o sección de tejidos indican que el proceso de replicación es similar en estas células.

Las características generales de la replicación de los rotavirus son:

- 1) las partículas virales son activadas por proteasas exógenas que inducen el clivaje de VP4, proteína de la cápside externa
- 2) la replicación es totalmente citoplasmática
- 3) las células no contienen enzimas para replicar el ARNdc, por lo tanto el virus debe proveer las enzimas necesarias
- 4) los ARN transcriptos virales (cadena+) son sustrato para la síntesis proteica y para la síntesis de ARN cadena negativa, que una vez sintetizado queda asociado al molde de cadena positiva formando el ARNdc genómico.
- 5) Los segmentos de ARNdc se sintetizan dentro de partículas subvirales, por lo cual nunca se encuentran en forma libre en el citoplasma de las células infectadas ARNdc ni ARN cadena-.
- 6) las partículas subvirales se forman en asociación con los viroplasmatas, y maduran por brotación a través de la membrana de R.E., proceso en el cual adquieren las proteínas de la cápside externa.
- 7) las partículas subvirales son liberadas por lisis celular.

En la Figura 1 se muestra una representación esquemática del ciclo de replicación viral en los rotavirus.

#### 3.1. Etapa inicial : *adsorción, penetración y desensamblado*

La infección de células por los rotavirus inicia presumiblemente por interacción de la partícula viral de triple cubierta (las de doble cubierta no son infectivas) con un receptor celular específico. Las glicoproteínas de la cubierta externa: VP7 y VP4 son las

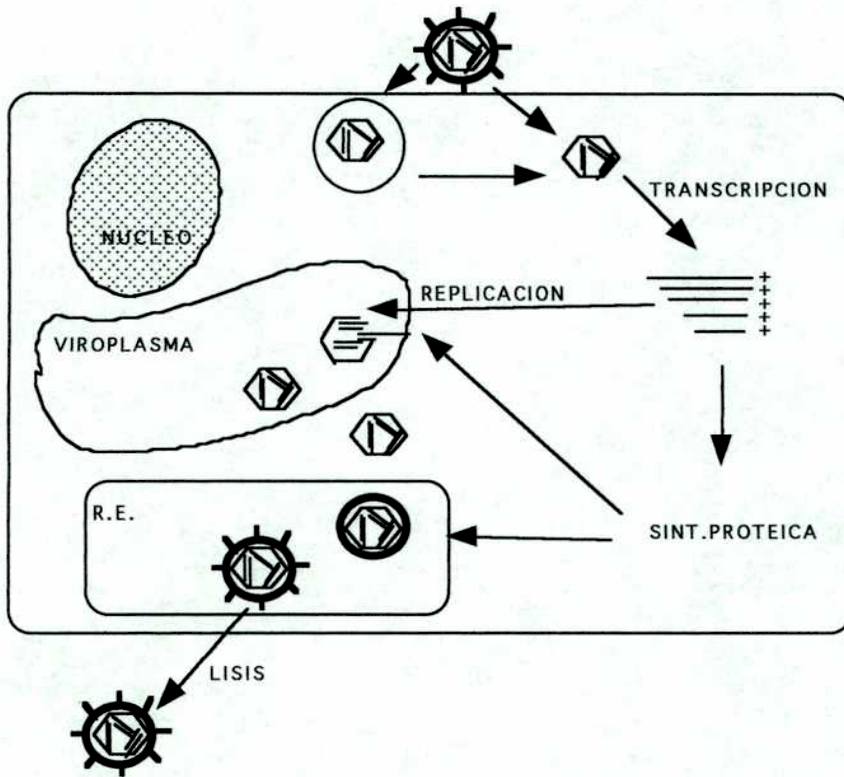


Figura 1: Esquema del ciclo replicativo de los rotavirus.

implicadas en las interacciones iniciales del virus con la célula huésped. La infectividad está estimulada por el clivaje proteolítico de VP4 en VP5\* y VP8\*. VP4 está involucrada en la interacción temprana del virus con la célula, participa en la unión del virus a células en cultivo (Ludert *et al.*, 1996), se une específicamente a glicoproteínas de alto peso molecular de células intestinales (Baas *et al.*, 1991) y esta unión específica se corresponde con el tropismo celular y el rango de huésped de los rotavirus. El rol de VP7 durante la interacción temprana del virus con la célula no ha sido aún definido, aunque se propone que podría modular la función de VP4. Luego de la unión inicial del virus a través de VP4, VP7 interacciona con moléculas de la superficie celular (Estes, 1996).

La identidad del receptor celular no se conoce, pero se sabe que algunas cepas de rotavirus animales requieren de residuos de ácido siálico en la membrana de la célula huésped para unirse e infectar la célula eficientemente, mientras que en los rotavirus humanos y otros rotavirus animales la infectividad es independiente de ácido siálico (Estes, 1996) (Ciarlet and Estes, 1999). La proteína que participa en la unión a residuos ácido siálico es la VP4, específicamente su fragmento proteolítico VP8\*. La existencia de cepas dependientes y cepas independientes de ácido siálico indican que en los rotavirus al menos hay dos mecanismos de unión a la célula huésped. Las primeras etapas de la infección requieren aparentemente de una serie secuencial de interacciones entre la partícula de rotavirus y moléculas de la superficie celular (Méndez *et al.*, 1999).

Luego de la adsorción el virus es internalizado. El mecanismo de entrada del virus a la célula no se conoce, pero se sabe que requiere procesos celulares activos, ya que la internalización no ocurre de 0-4°C, y depende del tratamiento previo de las partículas virales con tripsina (clivaje proteolítico de VP4). Las partículas de rotavirus activadas proteolíticamente entran a la célula en forma rápida ( $t_{1/2}$  de 5 a 10 minutos), mientras que las partículas no activadas entran por endocitosis, son degradadas y no resultan productivas en la infección (Suzuki *et al.*, 1985) (Kaljot *et al.*, 1988). Las partículas de rotavirus de triple cubierta activadas tienen capacidad de permeabilizar liposomas y células, y la proteína responsable de este proceso es VP5\* (fragmento proteolítico de VP4) (Denisova *et al.*, 1999). La permeabilidad mediada por VP5\* es selectiva de tamaño y no

lítica (Dowling *et al.*, 2000). A pesar que no ha sido descartado un mecanismo de entrada directo de los rotavirus, algunos trabajos recientes sugieren que las partículas de rotavirus se encuentran en vesículas en etapas inmediatas después de la infección (Ruiz *et al.*, 1997). VP5\* podría estar involucrada en la disminución de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el endosoma temprano, facilitando el desensamblado de la partícula viral. El desensamblado de la partícula viral libera las proteínas de la cubierta externa que se ha sugerido estarían involucradas en la lisis de la membrana del endosoma temprano (Ruiz *et al.*, 1997).

Una vez dentro de la célula el virus se activa perdiendo la cubierta externa. El desensamblado de la partícula viral ocurre como consecuencia de la baja concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  o dentro de endosomas tempranos, por disminución de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada probablemente por permeabilización selectiva por VP5\*. Es ya conocido que el agregado de agentes quelantes de  $\text{Ca}^{2+}$  producen la remoción de la cubierta externa y subsecuente activación del virus (Cohen *et al.*, 1979), y el incremento de la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  (mediante el uso de un ionóforo) en etapas tempranas de la infección bloquea la pérdida de la cubierta externa (Estes, 1996).

### 3.2. Transcripción

Luego de la penetración del virus y de la pérdida de su cubierta externa, las partículas de doble cubierta resultantes inician la síntesis de los 11 ARNm virales. Este proceso es realizado por la ARN polimerasa viral endógena dependiente de ARN (transcriptasa), que utiliza como molde el ARNdc genómico. La transcriptasa es un componente del virión y se activa tanto *in vivo* como *in vitro* por remoción de la cubierta externa (Cohen *et al.*, 1979).

Las partículas de doble cubierta con actividad de transcripción están compuestas por el core viral formado por las proteínas VP1 y VP3, los 11 segmentos de ARN genómico, la cubierta interna de VP2, y la cubierta media de VP6. Existen numerosas evidencias que VP1 es la polimerasa viral (transcriptasa), aunque sólo presenta actividad polimerasa en presencia de VP2 (Patton *et al.*, 1997). Los ARNm son modificados en su extremo 5' por el agregado de una estructura *cap* metilada ( $\text{m}^7\text{GpppG}^{\text{m}}$ ). Esta modificación requiere de 2

actividades enzimáticas atribuidas a la proteína VP3: guanidiltransferasa y metiltransferasa (Pizarro *et al.*, 1991) (Liu *et al.*, 1992) (Chen *et al.*, 1999). La transcripción requiere la presencia de VP6, aunque su función no se conoce.

### 3.3. Replicación

La síntesis de ARN<sub>dc</sub>, como en otros miembros de la familia Reoviridae, es un proceso asimétrico en el cual el ARN<sub>m</sub> viral actúa como molde para la síntesis del ARN cadena- (Patton, 1986). La replicación del genoma de rotavirus es citoplasmática, específicamente se produce en los viroplasmata, grandes inclusiones citoplasmáticas que se visualizan en células infectadas.

A partir de células infectadas han sido aislados distintos complejos subvirales con actividad replicativa *in vitro* que contienen el conjunto de los ARN<sub>m</sub> y distintas combinaciones de proteínas estructurales y no estructurales (Patton, 1986) (Patton and Gallegos, 1988). La densidad de estos complejos subvirales y su sensibilidad a RNasas indicarían que las moléculas de ARN<sub>m</sub>, molde para la síntesis de la cadena-, se extienden desde la superficie de las partículas hacia el exterior (Patton and Gallegos, 1988). Por el contrario el ARN<sub>dc</sub>, producto de la actividad de replicación de las partículas subvirales, es resistente a la digestión por nucleasas, lo cual indica que a medida que el ARN cadena+ es replicado las moléculas de ARN<sub>dc</sub> son secuestradas dentro de la partícula. La actividad replicativa está asociada con partículas que contienen las proteínas estructurales: VP1, VP2 y VP3 (Chen *et al.*, 1994), siendo los componentes esenciales de esta actividad VP1 y VP2 (Patton *et al.*, 1997) (Zeng *et al.*, 1996). Las proteínas no estructurales que forman parte de las partículas con actividad replicativa podrían estar relacionadas con el mecanismo de selección de los ARN<sub>m</sub> y con otras funciones en la replicación.

El ARN<sub>dc</sub> sintetizado permanece asociado a estas partículas replicativas, y en forma paralela a la síntesis del genoma viral se produce la morfogénesis de las partículas virales. El paso final de la morfogénesis de las partículas virales involucra la pérdida de las proteínas no estructurales y la adquisición de la cápside externa que ocurre durante el pasaje por el retículo endoplasmático.



### 3.4. Ensamblado

Los rotavirus se caracterizan por un modo único de morfogénesis en el cual la maduración y la producción viral está restringida al retículo endoplasmático. Las partículas subvirales de doble cubierta, compuestas por VP1, VP2, VP3 y VP6, formadas en los viroplasma brotan a través de la membrana del R.E.. Este proceso es mediado por la unión de VP6 a la proteína viral NSP4. La proteína viral NSP4, glicoproteína localizada en la membrana del R.E., actúa como receptor uniendo a las partículas subvirales citoplasmáticas y probablemente a VP4 (Au *et al.*, 1989) (Meyer *et al.*, 1989) (Au *et al.*, 1993). La unión de la partícula subviral y NSP4 es transiente, y NSP4 no es incorporada a la partícula madura que se ensambla en el lumen del R.E.. La partícula viral queda transitoriamente envuelta por una porción de membrana derivada del R.E.. Durante el proceso de maduración dentro del lumen del R.E. la membrana transitoria se pierde, probablemente mediante un proceso en el cual participa la actividad desestabilizadora de membrana de NSP4 (Tian *et al.*, 1996), y la partícula viral adquiere la cubierta proteica de los viriones maduros formada por VP7 y VP4. Los eventos y mecanismos involucrados en la maduración del virus, que incluye la adquisición de la cubierta externa y la pérdida de las proteínas no estructurales no están aún bien caracterizados.

Las partículas maduras quedan asociadas al R.E. y son liberadas por lisis celular.

#### 4. Mecanismos de variación y evolución en rotavirus

El genoma de los rotavirus está compuesto por 11 segmentos de ARNdc, cuyo perfil de migración por electroforesis en geles de poliacrilamida es constante para cada cepa. Los cambios en la posición de migración de cada segmento en particular han sido atribuidos a variaciones genéticas generadas tanto por 1) mutaciones puntuales, 2) intercambio de segmentos genómicos entre cepas distintas y 3) reordenamientos genómicos dentro de un mismo segmento.

##### 4.1. Fidelidad de la polimerasa

La generación de mutaciones puntuales en el genoma viral durante la replicación de los virus con genoma a ARN es una consecuencia de la poca fidelidad de las ARN polimerasas. La tasa de mutación, definida como el número de incorporaciones erróneas en un sitio nucleotídico por ciclo de replicación, se encuentra para los virus a ARN en el rango de  $10^{-3}$  a  $10^{-5}$  sustituciones por sitio y por ciclo, dependiendo de la polimerasa y del molde (Strauss and Strauss, 1988) (Domingo *et al.*, 1993). La falta de fidelidad refleja la falta de mecanismos de corrección en las ARN polimerasas (Steinhauer *et al.*, 1992). En el virus de influenza se evidenció que la polimerasa viral presenta actividad de excisión 3'-5', pero no ha sido demostrado que exista corrección de cadenas de ARN en elongación (Steinhauer and Holland, 1987).

A pesar de que la alta tasa de mutación es una característica común de los virus con genoma a ARN, en los rotavirus grupo A las secuencias de las regiones codificantes y no codificantes y el tamaño de los segmentos virales son altamente conservados (Desselberger and McCrae, 1994). Si bien la tasa de mutación en los rotavirus no fue cuantificada, la poca evidencia de cambios genéticos de este tipo pueden deberse tanto a un mecanismo de replicación muy preciso o a una alta presión de selección.

## 4.2. Intercambio de segmentos

Los virus con genoma segmentado pueden sufrir reasociación de su material genético por intercambio de segmentos entre distintas cepas en infecciones mixtas (*reassortment*). En los rotavirus cada segmento genómico contiene un gen viral y por lo tanto la infectividad de la partícula viral depende de la presencia del conjunto completo de segmentos virales. Durante la replicación y ensamblado se empaqueta una única copia de cada gen, que en infecciones mixtas puede provenir de una u otra cepa parental. Este intercambio de segmentos entre cepas ha sido observado experimentalmente tanto *in vivo* como *in vitro*.

Esta característica de los rotavirus de intercambiar segmentos virales entre distintas cepas ha sido usada como herramienta para asignar funciones virales a distintos genes, para amplificar en cultivo segmentos genómicos de cepas de rotavirus de crecimiento lento por recombinación con cepas de crecimiento rápido, para permitir el crecimiento en cultivo de cepas de rotavirus no adaptadas a células en cultivo. Los virus recombinantes obtenidos por intercambio de segmentos completos son también candidatos potenciales para el desarrollo y producción de vacunas.

## 4.3. Reordenamientos genómicos

Además de los mecanismos de variabilidad genética descritos en 4.1 y 4.2, comunes a todos los virus con genoma a ARN y a virus con genoma segmentado, los rotavirus y otros grupos pertenecientes a la familia reoviridae (orbivirus) presentan un tercer mecanismo de variación que involucra un reordenamiento en los segmentos genómicos. Los reordenamientos genómicos deben ser considerados como un mecanismo disponible en los rotavirus para generar cambios rápidos en el genoma viral, a pesar que son necesarios más estudios para determinar su importancia en la generación de diversidad genética en los rotavirus.

Los reordenamientos genómicos se manifiestan por un cambio en el perfil electroforético del genoma viral, característico para cada grupo de rotavirus. Los rotavirus del grupo A poseen un genoma de 11 segmentos de ARNdc usualmente de tamaños bastante

conservados: cuatro segmentos de alto peso molecular (segmentos 1-4), cinco de tamaño intermedio (segmentos 5-9) que incluyen un triplete, y dos segmentos menores (segmentos 10 y 11). En los rotavirus que presentan reordenamientos genómicos este perfil electroforético se encuentra modificado por falta de alguno de los segmentos característicos y la aparición de un segmento de tamaño generalmente mayor. La caracterización del genoma de estos rotavirus indica que este cambio en el perfil electroforético se debe generalmente a un incremento del tamaño del segmento genómico que como consecuencia migra de modo anómalo. Se han descrito en la literatura numerosos rotavirus que presentan este tipo de rearrreglos genómicos, algunos de estos virus fueron aislados de niños inmunodeficientes infectados crónicamente por rotavirus (Pedley *et al.*, 1984), (Hundley *et al.*, 1987), de niños inmunocompetentes con infecciones asintomáticas (Besselaar *et al.*, 1986) y de varias especies de animales (bovinos (Pocock, 1987), porcinos (Bellinzoni *et al.*, 1987) o conejos (Tanaka *et al.*, 1988). También se obtuvieron rotavirus con rearrreglos genómicos *in vitro* por pasaje repetido a alta multiplicidad de una cepa de rotavirus bovino adaptada a cultivo de tejidos (Hundley *et al.*, 1985).

Los reordenamientos pueden ocurrir en distintos segmentos genómicos. Han sido caracterizados rotavirus que presentan rearrreglos en los segmentos 5, 6, 7, 8, 10 y 11, siendo los mas frecuentes los correspondientes al segmento 11. Los rotavirus con reordenamientos en el segmento genómico 11 presentan un perfil electroforético más corto que el normal para el grupo de rotavirus A (rotavirus de "**electroferotipo corto**") debido a que el segmento 11 rearrreglado es más largo que el normal y por lo tanto tiene una movilidad menor en PAGE.

Los estudios de caracterización biofísica de las partículas de rotavirus estiman que cada partícula podría empaquetar hasta 1800 nucleótidos adicionales (10% del genoma viral) sin producir cambios en el tamaño ni en la densidad de la partícula (McIntyre *et al.*, 1987). Aparentemente, el tamaño de cada ARN individual empaquetado no parece ser una limitación estricta en el ensamblado de la partícula viral, pero sí parece ser importante el número de segmentos virales empaquetados. Estos datos coinciden con el hecho que se

han aislado rotavirus con segmentos genómicos de tamaño mayor que los normales pero no han sido nunca descritos rotavirus con un número mayor de segmentos virales.

Hasta el momento los reordenamientos genómicos descritos se pueden agrupar en dos tipos distintos. Los **rearrreglos de tipo I**, que involucran una duplicación parcial (cabeza-cola) del gen, y los **rearrreglos de tipo II**, en los que el incremento de tamaño se debe a la inserción de una secuencia rica en A y T en la región 3' no codificante del segmento viral. Se encuentran numerosos ejemplos en la literatura de rotavirus de distintas especies que presentan rearrreglos de tipo I en distintos segmentos virales. La mayor parte de los reordenamientos descritos involucran al segmento 11, como en el caso del rotavirus bovino C7/183 (Scott *et al.*, 1989), los rotavirus porcinos C60 (González *et al.*, 1989) y CC86 (Mattion *et al.*, 1990), el rotavirus de conejo cepa Alabama (Gorziglia *et al.*, 1989) y más recientemente los rotavirus humanos Mc345 (Kojima *et al.*, 1996) y Z10262 (Palombo *et al.*, 1998)). También han sido descritos rearrreglos por duplicación en otros segmentos, como el segmento 10 en el rotavirus humano A64 (Ballard *et al.*, 1992) y el segmento 5 en el rotavirus bovino brvE (Tian *et al.*, 1993) entre otros.

Los rearrreglos de tipo II, inserción de una secuencia rica en A y T, solo han sido descritos para el gen 11 de rotavirus humanos : RV5 y B37 (Nuttall *et al.*, 1989), DS-1 y 69M (Matsui *et al.*, 1990). En este caso, la secuencia insertada no presenta homología a otras partes del gen o a otros segmentos virales, excepto en las cepas 69M y B37, donde dentro de la región insertada se encuentra una secuencia de 18 nucleótidos idéntica a la secuencia comprendida entre la posición 446 y 463 de la región codificante de las cepas UK, Wa, C60 y VMRI.

Los virus con rearrreglos genómicos descritos hasta el momento no son defectivos, es decir que pueden realizar su ciclo replicativo, y han sido aislados frecuentemente como los únicos agentes causantes de la infección viral. En general, en la mayor parte de los reordenamientos genómicos descritos, el rearrreglo (concatemerización o inserción) no afecta la región codificante del segmento viral. Como excepción, los reordenamientos descritos en el segmento genómico 5 (que codifica para la proteína NSP1) de la cepa brvE de rotavirus bovinos (Tian *et al.*, 1993) afectan la región codificante aunque los virus

siguen siendo competentes en la replicación. Por otra parte se han descrito variantes virales no defectivas que presentan deleciones internas en este mismo gen (Hua and Patton, 1994) (Taniguchi *et al.*, 1996).

En la mayor parte de los casos, el perfil de proteínas virales en las células infectadas con rotavirus que presentan segmentos rearrreglados es similar observado en células infectadas con rotavirus normales, lo cual indica que la región codificante del gen no está afectada.

Por otra parte los segmentos rearrreglados son capaces de reemplazar a un segmento normal de otra cepa viral por reasociación de segmentos en infecciones mixtas (Allen and Desselberger, 1985) (Graham *et al.*, 1987).

En todos los segmentos rearrreglados secuenciados se mantienen las características generales de los segmentos de rotavirus, ya que las secuencias conservadas de los extremos 5' y 3' se encuentran presentes en la posición correcta y en copia única.

Estos rotavirus son estables y no revierten a la configuración original por pasaje *in vitro* o *in vivo*.

#### **4.4. Virus recombinantes**

La manipulación genética de los virus mediante el uso de técnicas de recombinación de ADN, ha contribuido a una mayor comprensión de la biología molecular de las infecciones virales. La introducción de mutaciones específicas en el genoma de un virus ha permitido en muchos casos el estudio de las funciones de genes individuales, y de secuencias del genoma viral que actúan regulando la replicación, la transcripción y el empaquetamiento viral. La construcción de virus con genomas modificados que llevan inserciones, deleciones o substituciones, también es esencial para el desarrollo de mutantes virales atenuadas. Por otra parte, la posibilidad de introducir secuencias exógenas en un genoma viral permite el desarrollo de vectores virales de expresión o virus recombinantes que presenten epitopes heterólogos.

Numerosos virus con genoma a ADN son usados actualmente como vectores de expresión de proteínas exógenas en cultivo de células: baculovirus (Miller, 1988) (restringido a células de insecto); poxvirus (vaccinia virus (Mackett and Smith, 1986),

(Moss, 1991) , (Scheiflinger *et al.*, 1992), 3]); herpesvirus (Herpes Simplex Virus (Roizman and Jenkins, 1985) y citomegalovirus (Spaete and Mockarski, 1987)); adenovirus (Graham, 1990) (Berkner *et al.*, 1987) (Morin *et al.*, 1987) (Crompton *et al.*, 1994) (Berkner, 1988); papovavirus (SV40) y parvovirus (Russell *et al.*, 1992). En algunos casos el ADN desnudo viral (deproteinizado) es infectivo, y los virus recombinantes se obtienen por recombinación homóloga intracelular entre un vector que contiene un *cassette* de expresión formado por un promotor viral asociado al gen de interés flanqueado por secuencias virales, y el ADN viral o un segundo plásmido que lleva el genoma del virus (herpesvirus, adenovirus o baculovirus). En el caso de virus en los cuales el ADN deproteinizado no es infectivo se requiere la infección con virus *helper* (poxvirus).

Algunos retrovirus también son usados para transferencia de genes y expresión de proteínas exógenas en células de mamíferos (Miller and Rosman, 1989). Los virus recombinantes infectivos se obtienen en este caso por complementación con virus salvaje o en líneas celulares que permiten el empaquetamiento (Eglitis and French Anderson, 1988). En virus con genoma a ARN cadena+ el ARN genómico viral es en general infectivo, es decir que la transfección del ARN viral en una célula huésped adecuada inicia infección viral y producción de partículas virales. Esto es posible porque el ARN+ transfectado puede ser usado directamente en la síntesis de proteínas virales necesarias para la replicación del ARN genómico y su empaquetamiento. Esta característica permite obtener virus recombinantes por mutagénesis dirigida de clones del ADNc del genoma viral (bacteriófagos, picornavirus, alfavirus, flavivirus, virus de plantas y virus de insectos). La transcripción *in vitro* del ADNc del genoma de estos virus, modificado o no, produce moléculas de ARN que resultan infectivas en las células adecuadas. De este modo se han desarrollado en: poliovirus (Racaniello and Baltimore, 1981),(Burke *et al.*, 1988) (Dedieu *et al.*, 1992), sindbis virus (London *et al.*, 1992), semliki forest virus (Liljeström and Garoff, 1991) y virus de plantas, vectores virales que portan epitopes heterólogos o expresan proteínas exógenas.

En contraste, el ARN cadena- y ARNdc no son infectivos por sí mismos, ya que no son molde directo para la traducción, y en ausencia de proteínas virales no es posible ni transcripción ni replicación viral. Por lo tanto, las estrategias utilizadas para obtener virus recombinantes en virus con genoma de ARN cadena- o ARNdc deben ser distintas a las expuestas previamente.

En virus con genoma a ARN cadena- el genoma se encuentra encapsidado dentro de la nucleocápside (proteína N) e íntimamente asociado a la ARN polimerasa viral. Para que el ARN viral introducido en una célula susceptible sea amplificado (replicación), expresado y se produzcan partículas virales, es necesario que se complemente con proteínas virales purificadas, con extractos de células infectadas o infectando la célula receptora con virus *helper*. Se encuentran en la literatura numerosos ejemplos de metodologías que permitieron obtener virus infectivos recombinantes a partir de ARN viral sintetizado *in vitro* a partir de clones de ADNc. En el virus de influenza se desarrolló un sistema eficiente de ensamblado *in vitro* del core viral (ribonucleoproteína (RNP)), incubando el ARN sintetizado *in vitro* con las tres subunidades de la polimerasa viral y la nucleoproteína purificadas. El complejo ARN-proteína es transfectado en células susceptibles infectadas con virus *helper* obteniéndose virus recombinantes que llevan el segmento de ARN exógeno (Luytjes *et al.*, 1989). También se obtuvieron recombinantes por complementación con proteínas virales (nucleoproteína y polimerasas) expresadas intracelularmente por virus recombinantes: vaccinia (Huang *et al.*, 1990) o SV40 (Luna *et al.*, 1993). En rhabdovirus, VSV (Pattnaik *et al.*, 1992) y virus de la rabia (Conzelmann and Schnell, 1994)), el ARN cadena- viral, transcrito intracelularmente a partir de ADNc por el sistema de la polimerasa T7 y complementado con proteínas virales expresadas por plásmidos co-transfectados, es expresado, amplificado y empaquetado en partículas virales infectivas. En paramixovirus, Sendai virus (Park *et al.*, 1991) y RSV (Collins *et al.*, 1991), la transfección de ARN cadena- desnudo en células infectadas es suficiente para producir amplificación y expresión del gen exógeno con producción de partículas virales recombinantes. En Sendai virus, la preincubación del ARN con extractos proteicos de



células infectadas incrementa el nivel de expresión del gen exógeno en células previamente infectadas con virus salvaje.

En el caso de virus con genoma a ARNdc, los avances para desarrollar sistemas para obtener virus recombinantes han sido menos exitosos.

En los virus L-A de *Saccharomyces cerevisiae* a ARNdc, fue desarrollado un sistema de replicación y transcripción *in vitro* que permite la síntesis de ARNdc y ARN cadena+ a partir de ARN agregado exógenamente. En condiciones de baja fuerza iónica, las partículas del virus L-A se abren liberando el ARNdc endógeno, se hacen accesibles al ARN cadena+ agregado exógenamente que es utilizado como molde para la síntesis de ARNdc (Fujimura and Wickner, 1988). El mismo sistema fue utilizado para sintetizar ARN cadena+ a partir de ARNdc agregado exógenamente al sistema de partículas abiertas vacías (Fujimura and Wickner, 1989). Este sistema de partículas vacías ha permitido el estudio *in vitro* de secuencias del ARN genómico en *cis* necesarias para la replicación y transcripción viral, y la determinación de regiones del ARN involucradas en el empaquetamiento. Por otra parte, la transcripción de ARN cadena+ a partir de plásmidos de expresión en células de levadura que contienen el virus L-A, ha permitido el estudio *in vivo* de las secuencias del ARN viral involucradas en el empaquetamiento en partículas virales (VLP) (Fujimura *et al.*, 1990).

En el caso del bacteriófago  $\phi 6$ , virus a ARNdc que infecta el patógeno de plantas *Pseudomonas phaseolicola*, la unidad replicativa y de transcripción es la procápside formada por 4 proteínas virales. La expresión de las 4 proteínas virales en *E. coli* o *P. phaseolicola* produce el ensamblado de procápsides que permiten la replicación y empaquetado de ARN agregado exógenamente (Gottlieb *et al.*, 1990). El agregado de la proteína viral P8 a las procápsides replicadas *in vitro*, genera nucleocápsides infecciosas, lo que permite tener un sistema de producción de virus recombinantes con mutaciones específicas (Olkkonen *et al.*, 1990), (Mindich *et al.*, 1992).

En Rotavirus no ha sido posible obtener virus recombinantes que hayan incorporado en su genoma ARN exógenos sintetizados *in vitro*. Hasta el momento, el único método para modificar el genoma viral en rotavirus es a través del uso de mutágenos o por intercambio

de segmentos genómicos en infecciones mixtas (reasociación). El intercambio de segmentos genómicos entre cepas distintas en rotavirus han sido ampliamente usado para asignar mutaciones termosensibles y correlacionar propiedades biológicas a segmentos genómicos específicos. Este tipo de recombinantes está limitado únicamente al intercambio de segmentos genómicos que ocurren naturalmente en rotavirus, sin la posibilidad de incorporar mutaciones dirigidas.

En rotavirus fueron desarrollados sistemas de transcripción y replicación *in vitro*. El ARN viral es transcrito *in vitro* a partir de partículas virales purificadas activadas por agentes quelantes (Cohen *et al.*, 1979) (Mason *et al.*, 1980). También ha sido posible obtener síntesis de ARNdc (replicación) *in vitro* a partir de partículas subvirales purificadas de extractos de células infectadas (Patton, 1986). En ambos casos el ARN viral endógeno actúa como molde para la síntesis de ARN cadena+ (a partir de ARNdc) y ARNdc (a partir de ARN cadena+). En años más recientes se han desarrollado sistemas de replicación *in vitro* que permiten la síntesis de ARNdc a partir de moldes de ARNsc de rotavirus sintetizados *in vitro* y agregados exógenamente. Estos sistemas son de dos tipos: a) sistemas de cores abiertos, preparados a partir de viriones nativos (Chen *et al.*, 1994), y b) sistemas de partículas tipo virus (VLP) producidas por coexpresión de proteínas virales en sistema de baculovirus (Chen *et al.*, 1994) (Zeng *et al.*, 1996).

Ninguno de los sistemas descritos permite el desarrollo de progenie viral recombinante infectiva, con incorporación al genoma viral de genes exógenos, pero aportan información respecto al proceso de replicación viral, permitiendo el estudio de las proteínas y las secuencias virales involucradas.

En 1990, Roner *et al.* (Roner *et al.*, 1990) publicaron un trabajo en el cual demostraban que el ARN cadena+ de reovirus, virus pertenecientes a la familia Reoviridae, sintetizado *in vitro* por partículas purificadas resultaba infeccioso al ser transfectado en células infectadas con un reovirus *helper* perteneciente a un serotipo distinto. Sin embargo, no existen trabajos posteriores que confirmen la posibilidad de usar este sistema en rotavirus. La formación en rotavirus de virus recombinantes, por incorporación al genoma viral de ARN exógenos, permitiría la incorporación de mutaciones dirigidas en los genes virales, lo

cual posibilitaría estudios detallados de la estructura y función de los distintos genes, y el eventual desarrollo de vacunas atenuadas por ingeniería genética.

## **5. Biología de los Rotavirus**

### **5.1. Patología**

Los Rotavirus son los principales agentes virales causantes de diarrea aguda en niños y también son causa frecuente de enfermedad y mortalidad en muchas especies de animales. La diarrea causada por rotavirus es la principal causa de mortalidad en niños, en muchas partes del mundo, provocada principalmente por deshidratación severa. En terneros y cerdos la enteritis causada por infección con rotavirus produce grandes pérdidas económicas ya sea por muerte o pérdida de peso en animales infectados.

El virus tiene un tropismo celular bastante limitado, infectando en la mayor parte de los casos únicamente las células epiteliales maduras de las vellosidades del intestino delgado. Por otra parte, las infecciones sintomáticas generalmente están restringidas a los individuos jóvenes de una determinada especie. Cada virus presenta, además, restricción respecto al rango de huéspedes que infecta.

La multiplicación de los rotavirus en las células epiteliales de las vellosidades del intestino delgado resulta en la lisis y la pérdida de la estructura normal de las vellosidades. Los cambios histológicos que se producen como consecuencia de la infección por rotavirus son en general comunes en todas las especies estudiadas. Comprenden un acortamiento y atrofia de las vellosidades del intestino delgado y un cambio del epitelio maduro columnar por células epiteliales cuboidales inmaduras, no susceptibles de infección. Los cambios histológicos van acompañados por cambios funcionales ya que la destrucción del epitelio maduro de las vellosidades conduce a una mala absorción de carbohidratos y en consecuencia a una diarrea osmótica. Se ha observado que en epitelios infectados la absorción de sodio acoplada a glucosa se encuentra disminuída.

#### *Características clínicas en humanos*

En general el período de incubación es de 24 a 48 horas, seguido de un período de 3-8 días con diarrea y vómitos, en el cual puede también desarrollarse fiebre. Normalmente no hay otras secuelas que la intolerancia temporaria a la lactosa, sin embargo, sin una adecuada hidratación el síndrome puede resultar en deshidratación severa y muerte.

## 5.2. Epidemiología

En humanos, el pico de incidencia de diarrea causada por rotavirus es en niños entre 6 meses y 2 años de edad, aunque en países en desarrollo también pueden ser afectados niños menores de 6 meses. La mayor parte de los niños de alrededor de 4 años de edad ya han sido infectados por rotavirus al menos una vez y son inmunes al síndrome de deshidratación severa, pero la confrontación con altos inóculos o una baja inmunidad puede producir enfermedad suave en niños mayores o adultos. Las infecciones por rotavirus en niños menores de 3 o 6 meses son generalmente benignas, probablemente debido a la presencia de anticuerpos maternos transferidos durante el tercer trimestre. Las reinfecciones con rotavirus son por lo general asintomáticas o asociadas con síntomas más leves que la infección primaria. Estos resultados alientan la idea que la vacunación en los primeros meses de vida puede proteger contra infecciones severas con rotavirus.

El virus presenta características estacionales, con un pico de incidencia de la enfermedad en los meses de invierno.

Originalmente se pensó que los rotavirus que afectan humanos estaban restringidos al grupo A. Sin embargo, en 1982, una epidemia de rotavirus grupo B afectó a adultos, niños y neonatos en China (Hung *et al.*, 1984), y desde ese momento se han detectado varios picos epidémicos de rotavirus grupo B en China. También han sido detectados en humanos en distintas partes del mundo rotavirus del grupo C (Bridger *et al.*, 1986) y aunque su importancia como enfermedad endémica no es conocida, en Japón e Inglaterra se han detectado ocasionalmente epidemias (LeBaron *et al.*, 1990).

## 5.3. Inmunidad a infecciones por rotavirus humanos

Las infecciones por rotavirus son muy superficiales y comprenden la multiplicación viral restringida a las células epiteliales maduras de la superficie de las vellosidades del intestino delgado. En huéspedes inmunocompetentes no existe evidencia de infección sistémica.

La infección con rotavirus humano produce el desarrollo de anticuerpos anti-rotavirus de clase IgA e IgM en saliva, duodeno y heces, y de clase IgG, IgM e IgA en suero

(Grimwood *et al.*, 1988). Los anticuerpos IgG del suero y copro-IgA pueden persistir por largos períodos, especialmente si son reforzados por reinfecciones (Coulson and Masendycz, 1990). La infección primaria resulta también en el desarrollo de anticuerpos neutralizantes contra el serotipo del virus infectante en suero e intestino. Varios estudios en animales y en niños han sugerido que la protección contra rotavirus está mediada primariamente por inmunidad local intestinal. Estas características han impulsado el desarrollo de vacunas vivas atenuadas y de administración oral capaces de estimular la inmunidad mucosal.

La infección por rotavirus induce también una respuesta inmune mediada por células (Offit and Dudzik, 1989), que probablemente, junto con la inducción de anticuerpos juega un rol importante en la inmunidad adquirida a subsecuentes infecciones.

#### **5.4. Desarrollo de vacunas**

##### ***Vacunas humanas***

La infección por rotavirus causa alrededor de 1 millón de muertes por año en todo el mundo. En países desarrollados la cantidad de muertes causadas por infecciones por rotavirus en niños es menor, pero es muy frecuente la hospitalización. Estos datos indican que el mejoramiento de las fuentes de agua, condiciones sanitarias o de higiene no es suficiente para erradicar o controlar eficientemente los casos de diarrea infantil, y que es necesario el desarrollo de una vacuna efectiva.

Para el desarrollo de una vacuna se deben tener en consideración los mecanismos inmunológicos naturales de protección después de una infección, la identificación de los antígenos que inducen esta protección, la selección de virus vivos atenuados que presenten estos antígenos o la producción de estos antígenos por técnicas de biología molecular, además de los controles de seguridad y de eficiencia de protección de la vacuna en animales y luego en humanos.

Las partículas de rotavirus contienen 6 proteínas, cada una de ellas presenta múltiples epitopes capaces de inducir anticuerpos específicos. Sin embargo, solo VP4 y VP7, que forman la cápside externa, inducen la producción de anticuerpos capaces de neutralizar el

virus *in vitro* y de proteger animales experimentales *in vivo* (Kapikian and Chanock, 1990).

La existencia de múltiples serotipos de rotavirus humanos hace importante para el desarrollo de vacunas conocer la distribución anual y en el mundo de estos serotipos, su estabilidad antigénica, cual es el rango de huésped de cada serotipo, y si la infección con un virus de un serotipo determinado puede inducir inmunidad protectora contra virus de otros serotipos. La distribución de los serotipos no es predecible, por lo tanto una vacuna eficiente debería inducir protección contra los serotipos circulantes más prevalentes.

La estrategia inicial fue el desarrollo de vacunas vivas de administración oral, con cepas atenuadas de rotavirus, ya que se asumió que la estimulación de anticuerpos en la mucosa local era el determinante principal de resistencia a la infección.

Inicialmente se desarrollaron vacunas monovalentes a partir de cepas atenuadas de rotavirus animales, relacionadas antigénicamente con los rotavirus humanos. Hasta el momento, las vacunas monovalentes candidatas han sido derivadas de rotavirus bovino y de simio. Las primeras vacunas que han sido analizadas llegando a la fase 3 de ensayos clínicos fueron las cepas atenuadas bovinas RIT 4237 (proveniente de pasajes en cultivo de la cepa NCDV) y WC3, ambas de serotipo G6, que resultaron en protección cruzada contra el serotipo humano G1; y la cepa atenuada RRV (serotipo G3) proveniente de rotavirus de simio. Los resultados de protección obtenidos no fueron uniformes, dando muy baja inmunogenicidad en niños de países en desarrollo (Bishop, 1993) (Conner *et al.*, 1994) (Vesikari *et al.*, 1987). La evaluación de vacunas monovalentes quedó descartada, principalmente por el conocimiento de la existencia de múltiples serotipos que infectan al hombre y que la protección contra la primera infección tiende a ser serotipo específica.

Las vacunas en desarrollo y en fase de estudio actualmente son vacunas multivalentes. Las vacunas multivalentes se han desarrollado mediante la obtención de virus reasociados (*reassortant*) por intercambio de segmentos, incorporando el segmento 9 que codifica para la proteína VP7 de los cuatro serotipos epidemiológicamente importantes de los rotavirus humanos (G1-G4) al genoma de cepas de rotavirus de simio o bovinos. La vacuna más ampliamente estudiada es la vacuna tetravalente de Wyeth/Lederle (RRV-TV),

que incluye los serotipos G1 a G4, responsables de más del 90% de infecciones. Los 4 rotavirus presentes en esta vacuna corresponden al rotavirus de mono rhesus de serotipo G3, y a rotavirus obtenidos por reasociación de este virus con segmentos 9 (VP7) de rotavirus humanos correspondientes a los serotipos G1, G2 y G4. Se han desarrollado en los últimos 10 años diversos ensayos clínicos que demuestran que la vacuna es segura y que los niveles de protección alcanzados son similares a los observados luego de la primo infección natural con rotavirus. La vacuna RRV-TV ha sido recientemente (agosto 1998) aprobada por la "Food and Drug Administration" (FDA) de los EEUU.

Otra estrategia en el desarrollo de vacunas ha sido el uso de cepas atenuadas de rotavirus humanos (M37), de modo de mimificar mejor las cepas de rotavirus humanos que ocurren naturalmente, pero hasta el momento no se han obtenido resultados de protección eficiente.

Como alternativa estratégica se ha propuesto también el uso de vacunas no replicativas, pero hasta el momento no ha sido demostrada la capacidad de estas vacunas de inducir inmunidad activa. Se han propuesto el uso de viriones intactos de rotavirus inactivados, cápsides vacías (sin ARN), proteínas recombinantes y péptidos sintéticos. Hasta el momento han sido expresadas en distintos vectores (E.coli, vaccinia virus, baculovirus y Salmonella) copias totales o parciales de VP7 o VP4. La mayor parte de las proteínas recombinantes producidas son capaces de reaccionar *in vitro* con antisueros pero muestran poca inmunogenicidad cuando son inoculadas en animales experimentales. La relativa pobre inmunogenicidad de estos sistemas recombinantes, particularmente de VP7, está relacionada con la importancia conformacional de los epitopes nativos. Se está estudiando también la posibilidad de realizar vacunas con vectores de expresión vivos, tanto bacterianos: Salmonella, Mycobacteria, como virales: vaccinia (Andrew *et al.*, 1992; Andrew *et al.*, 1990), adenovirus (Gorziglia and Kapikian, 1992) (Both *et al.*, 1993), pero hasta el momento no existen resultados respecto a la posibilidad de uso.

Mediante el uso de anticuerpos monoclonales han sido identificados distintos epitopes inmunológicamente importantes en VP7 y VP4, y se han diseñado péptidos sintéticos capaces de inducir anticuerpos neutralizantes. Los estudios realizados con proteínas



recombinantes y péptidos han aportado información respecto a la respuesta inmune a la infección con rotavirus, pero hasta el momento no existe información de que produzcan una estimulación primaria de la respuesta inmune local en intestino.

### ***Vacunas para animales***

Las infecciones de rotavirus en animales también son significativas. Las muertes producidas por diarrea neonatal (5-20%) en bovinos, el pobre crecimiento y la reducida producción en animales recuperados de infecciones, y el aumento de la susceptibilidad en animales infectados por rotavirus a otras infecciones secundarias, producen grandes pérdidas económicas.

Los primeros intentos de producción de vacunas contra rotavirus en animales fueron realizados en vacunos. La primer vacuna fue una cepa atenuada de rotavirus bovino administrada oralmente a vacunos o porcinos en el momento del nacimiento. Los resultados no fueron satisfactorios, probablemente por neutralización del virus en el intestino por anticuerpos maternos adquiridos pasivamente, exposición a cepas de campo más virulentas antes de que pueda ser inducida una respuesta inmune a la vacuna o fallas en la inducción de respuesta inmune heterotípica.

En la mayor parte de los animales con interés económico las infecciones por rotavirus ocurren en el primer mes de vida. Por otro lado, dado que no existe transferencia de anticuerpos maternos a través de la placenta y que las crías reciben anticuerpos solo a través del calostro y leche materna, el interés fue centrado en la vacunación de las madres para estimular la secreción de altos títulos de anticuerpos en el calostro y la leche ingerida por el neonato. Han sido realizadas numerosas pruebas experimentales y de campo de vacunas pasivas, y en casi todos los casos producen un incremento en anticuerpos neutralizantes en suero, calostro y leche. La eficacia de la vacunación pasiva en cuanto a la protección contra infecciones de rotavirus es menos definida, pero existen resultados que reportan una disminución en la mortalidad y en la incidencia de diarrea.

# **CAPITULO I**

## **Reordenamientos genómicos en rotavirus humanos**

## **OBJETIVOS**

El objetivo de este capítulo es el estudio de la estructura molecular del segmento 11 en distintos rotavirus humanos de "electroferotipo corto". Estos rotavirus fueron aislados de niños con gastroenteritis aguda en un estudio epidemiológico realizado por Gómez y col. en Argentina (Gómez *et al.*, 1986) y fueron caracterizados como rotavirus de "electroferotipo corto" debido a la migración anómala del segmento 11 en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

La secuenciación del segmento 11 de los distintos rotavirus con "electroferotipo corto" aislados y la comparación de sus secuencias con la secuencia de un segmento 11 "normal" permitirá caracterizar la estructura molecular del reordenamiento responsable del incremento de tamaño en estos segmentos genómicos. El estudio comparativo de los reordenamientos en el segmento 11 de estos aislamientos virales y de otros rotavirus de "electroferotipo corto" descritos en la literatura, podría aportar información sobre los mecanismos por los cuales se producen estos reordenamientos genómicos en los rotavirus y la implicancia de este mecanismo en la variabilidad genética de los rotavirus. Por otra parte, la caracterización de los reordenamientos en distintos rotavirus podría contribuir al seguimiento de estos virus en estudios epidemiológicos.

Con este objetivo se realizó:

- La determinación de la secuencia de nucleótidos del segmento 11 de los distintos rotavirus aislados.
- La comparación de las distintas secuencias obtenidas entre sí y con secuencias del mismo segmento de otras cepas de rotavirus grupo A publicadas.

## ***RESULTADOS***

## 1. Origen de los virus

Los virus analizados provienen del estudio epidemiológico realizado en Argentina por Gómez y col. en el período comprendido entre abril de 1983 y abril de 1985. En este estudio fueron analizadas muestras de materia fecal tomadas de niños con gastroenteritis aguda, con edades entre 1 y 30 meses (Gómez *et al.*, 1986). En el 19,8% de las muestras analizadas se detectó, por técnicas de ELISA, la presencia de rotavirus como agente infeccioso causante de la diarrea. El estudio epidemiológico se basó en el análisis electroforético del ARNdc del genoma viral de los rotavirus aislados de las muestras de materia fecal, ya que la migración electroforética de los segmentos genómicos en gel de poliacrilamida (gel de Laemmli) es característica y constante para un determinado aislamiento viral. Los estudios electroforéticos revelaron que un 84,9% de las muestras presentan rotavirus con "electroferotipo normal" característico de rotavirus grupo A, con 35 perfiles distintos de migración, y el 15,1% presenta "electroferotipo corto" con un único perfil de migración. Los rotavirus con "electroferotipo corto" presentan características epidémicas, mientras que los de electroferotipo largo se encuentran distribuidos durante todo el año. Los rotavirus con "electroferotipo corto" pertenecen al serotipo G2, mientras que los de electroferotipo largo a los serotipos GI, G3 y G4 (Gómez *et al.*, 1990).

Todos los niños, de los cuales provienen las muestras, fueron admitidos en el Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez de Buenos Aires y Hospital de Niños de San Justo presentando síntomas de diarrea aguda y las muestras fueron tomadas en el momento de la hospitalización, por lo tanto se considera que las infecciones no son de origen hospitalario y los aislamientos se pueden considerar independientes. Por otra parte, los virus con "electroferotipo corto" fueron aislados de muestras que presentan un único perfil de ARN genómico viral lo que indica que la infección no es mixta y que estos virus no son defectivos.

Como en otros rotavirus de "electroferotipo corto" el perfil electroforético de estos virus se caracteriza por la desaparición del segmento que migra en la posición del segmento 11 normal, y la aparición de un nuevo segmento que migra entre los segmentos 10 y 9. Este

tipo de perfil electroforético se corresponde con el observado en rotavirus que presentan un reordenamiento en el segmento 11 con un incremento en el tamaño del segmento y por lo tanto una menor movilidad en SDS-PAGE.

## **2. Determinación de la estructura molecular del segmento 11 en rotavirus humanos de electroferotipo corto.**

Con el objetivo de analizar el reordenamiento genómico de estos rotavirus humanos de "electroferotipo corto" se decidió estudiar el segmento 11 de 6 rotavirus con "electroferotipo corto" (v47, v51, v61, v115, v158, v252) y de un rotavirus con "electroferotipo normal" (v183), provenientes de aislamientos independientes del muestreo realizado por Gómez y col. (Gómez *et al.*, 1986).

El ARN genómico viral fue extraído de muestras de materia fecal de niños (materiales y métodos), provenientes la mayor parte de los alrededores de Buenos Aires (v47, v51, v115, v158, v252, v183), con excepción de una muestra proveniente de la provincia de Formosa (v61). El ARN genómico purificado fue resuelto en gel de poliacrilamida (gel de Laemmli, (Laemmli, 1970)) y visualizado por tinción con plata (materiales y métodos). El perfil de ARN genómico de los distintos virus analizados se muestra en la Figura 2, donde se señala la posición del segmento 11 normal (v183) y del segmento de migración anormal (v47, v51, v61, v115, v158, v252). Todos los virus con "electroferotipo corto" presentan un mismo perfil electroforético.

Para purificar los segmentos de interés, el ARN genómico de los distintos virus fue separado por electroforesis en gel de agarosa y visualizado por tinción con bromuro de etidio. El segmento 11 del rotavirus v183 y los segmentos de migración anómala de los rotavirus v47, v51, v61, v115, v158, v252, fueron purificados del gel de agarosa.



**Figura 2: Perfil electroforético de los rotavirus humanos de electroferotipo corto v47, v51, v61, v115, v158, v252, v183:** ARN genómico viral extraído de muestras de materia fecal.

**OSU:** ARN genómico viral extraído de la cepa OSU de rotavirus porcino crecido en cultivo.

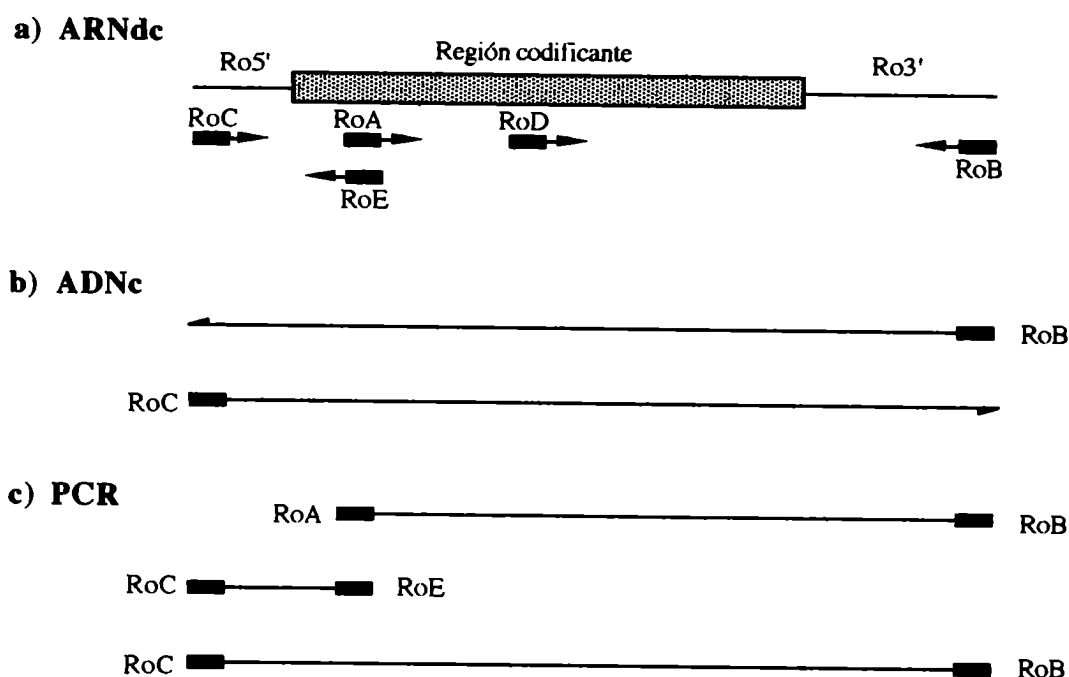
Los ARNs fueron resueltos en gel de acrilamida 10% (Laemmli) y visualizados por tinción con plata. Se indican con flechas los segmentos 11 de tamaño normal (664 nt) y rearmados (821 nt)

El ARN genómico total y el ARN de los segmentos purificados, fueron utilizados como molde para la síntesis de ADNc del segmento 11 por transcripción reversa y posterior amplificación por PCR (RT/PCR). La secuencia de los oligonucleótidos diseñados para la RT/PCR corresponde a regiones del segmento 11 conservadas en todas las cepas de rotavirus del grupo A, incluso en aquellas que presentan rearrreglos. Los oligonucleótidos RoA o RoB fueron utilizados alternativamente para la síntesis del ADNc del segmento 11 (Fig.3b). El producto de transcripción reversa fue amplificado por PCR con los pares de oligonucleótidos: RoA/RoB, RoC/RoB o RoC/RoE (Fig.3c) y los productos obtenidos en la RT/PCR fueron resueltos en gel de agarosa. Los productos de amplificación a partir del ARN (genómico total o del segmento 11 purificado) del v183 son los esperados para un segmento 11 normal, RoA/RoB 460nt, RoC/RoE 200nt y RoC/RoB de aproximadamente 600nt (Fig.3c). En el caso de los virus de "electroferotipo corto": v47, v51, v61, v115, v158 y v252, el producto de RT/PCR con el par de oligonucleótidos RoC/RoE tiene un tamaño equivalente al obtenido para el v183 (200nt), en cambio, los productos obtenidos con los oligonucleótidos RoA/RoB y RoC/RoB son de mayor tamaño (aproximadamente 600 y 800nt respectivamente). Estos datos indicarían que el gen 11 tiene aproximadamente 800nt, que correspondería al tamaño estimado para el segmento genómico que migra entre los segmentos 10 (750nt) y 9 (1062nt) en estos virus de "electroferotipo corto".

Los resultados indican que: 1) el segmento de migración anómala corresponde al gen 11, o presenta secuencias comunes con este gen, 2) el incremento de tamaño de este segmento se encuentra en la región 3' del gen, ya que el producto de amplificación RoC/RoE presenta el tamaño esperado para el gen 11 normal.

Los fragmentos amplificados fueron purificados y clonados en el plásmido pUC18 y se secuenciaron distintos clones con los oligonucleótidos universal y reverso, y el oligonucleótido RoD, interno al segmento 11. La estrategia de clonado no permite conocer la secuencia exacta de los extremos 5' (24 nt) y 3' (18 nt), ya que la secuencia obtenida corresponde a las secuencias de los oligonucleótidos utilizados en la transcripción reversa y amplificación.





**Figura 3: Oligonucleótidos utilizados en el clonado y secuenciación del segmento 11.**

a) Representación esquemática del segmento 11 (ARNdc) y ubicación de los oligonucleótidos usados en la amplificación del segmento 11.

Ro5' y Ro3' indican las regiones no traducidas del segmento 11 de rotavirus.

b) Productos de transcripción reversa (oligonucleótidos B y C)

c) Productos de amplificación (PCR)

**RoA:** 5'GATATTGGACCATCTGA3' (nt 196 a 212, cadena +)

**RoB:** 5'GGTCACAAAACGGGAGTG3' (nt 647 a 664, cadena -)

**RoC:** 5'GGCTTTTAAAGCGCTACAGTGATG3' (nt 1 a 24, cadena+)

**RoD:** 5'GATGCTACAGTGGACTCTTC3' (nt 376 al 395, cadena+)

**RoE:** 5'TCAGATGGTCCAATATC3' (nt 196 a 212, cadena -)

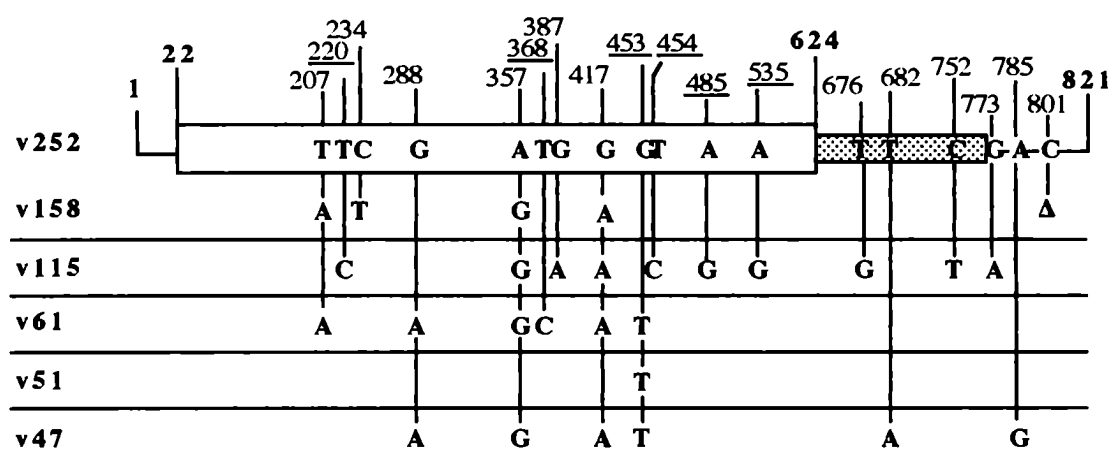
Las secuencias obtenidas de los distintos clones confirman que el ADNc amplificado corresponde al segmento 11. De acuerdo a la secuencia (Figs. 4 y 5) el tamaño del segmento 11 de los virus con "electroferotipo" corto es de 821 nt (excepto el segmento 11 del v158 que presenta 820 nt), 157 nt más largo que el segmento 11 secuenciado del v183 de 664 nt.

El incremento de tamaño del segmento 11 en estos virus se debe a la inserción, en el extremo 3' no traducido, de una secuencia de 148 nucleótidos rica en A+T (78%) (rearrreglo de tipo II). La inserción tiene lugar inmediatamente después del codón de terminación de la traducción y no afecta la región codificante del gen. A continuación de la inserción se retoma la secuencia del segmento 11 normal de modo que las últimas 49 bases corresponden al extremo 3' conservado (Fig.4). Las secuencias no codificantes de los extremos 5' (21 nucleótidos) y 3' (49 nucleótidos) del segmento 11 rearrreglado de los 6 virus estudiados no cambian su posición ni número, en forma similar a otros rotavirus con reordenamientos. Los 9 nucleótidos restantes que presentan los segmentos 11 reordenados de los virus de "electroferotipo corto" estudiados respecto del v183, corresponden a la inserción de 3 codones en la región codificante (ver más adelante).

### **3. Homología de la secuencia del segmento 11 rearrreglado en distintos rotavirus humanos**

Las secuencias del segmento 11 de los 6 aislamientos virales con "electroferotipo corto" analizados son muy conservadas entre sí (GenBank: v252: X76780, v61: X76783, v51: X76782, v47: X76781, v158: X76778, v115: X76777). El grado de identidad a nivel de nucleótidos entre las distintas secuencias es mayor del 98,8%. Dada la alta homología entre las secuencias de los segmentos 11 de los distintos aislamientos estudiados se tomó el segmento 11 del v252 como modelo y su secuencia completa se presenta en la Figura 4. La estructura del segmento 11 rearrreglado de estos virus de "electroferotipo corto" se encuentra esquematizada en la Figura 5, señalando los cambios de nucleótidos entre las secuencias de los distintos aislamientos respecto a la secuencia del v252.





**Figura 5: Representación esquemática de la estructura del segmento 11 rearrreglado de los rotavirus humanos analizados**

Esquema de la estructura del segmento 11 en los rotavirus humanos de electroferotipo corto analizados. Los números indican las posiciones donde existen diferencias respecto a la secuencia del v252, en cada caso se indica el cambio de nucleótido correspondiente para cada aislamiento viral. Las posiciones subrayadas indican mutaciones que introducen cambio de aminoácido. Δ: significa delección de un nucleótido. Los números en negrita indican el inicio y fin del segmento y el inicio y fin de la región codificante de NSP5. La barra gris representa la inserción de 148 nt. Región codificante: del nucleótido 22 al nucleótido 624

La mayor parte de las sustituciones están localizadas dentro de la región codificante, entre los nucleótidos 350 y 500, que coincide con la región de mayor variabilidad entre cepas distintas (López and Arias, 1993). Algunos de los cambios son compartidos por más de un virus, A207, A288, G357, A417, T453, sugiriendo que estos virus podrían tener un origen común. Usando siempre como referencia el aislamiento v252, la secuencia que presenta menor cantidad de cambios es la v51, con una sustitución de T por G en la posición 453, que introduce un cambio de aminoácido, y el mayor número de sustituciones se presentan en el aislamiento v115, en el cual se observaron 10 sustituciones (9 transiciones), 7 de las cuales en la región codificante introduciendo 4 cambios de aminoácidos. Es importante remarcar que las diferencias no podrían ser consecuencia de errores introducidos durante la amplificación, ya que a) distintos clones provenientes del mismo virus tienen secuencias idénticas, b) los cambios no están distribuidos aleatoriamente, sino que la mayor parte de ellos se localiza en la parte central del gen, c) la tasa de mutación es mucho mayor que la descrita para la Taq polimerasa (Eckert and Kunkel, 1990).

Comparando la secuencia del segmento 11 de v252 con el segmento 11 del v183 de "electroferotipo normal" (Fig. 4) (GenBank: X76779), la similitud a nivel de nucleótidos disminuye a un 84%, además de presentar una delección de 9 nucleótidos. La proteína NSP5 codificada por el gen 11 del v183, presenta por lo tanto tres aminoácidos menos que la NSP5 de los otros aislamientos virales estudiados, y 33 sustituciones de aminoácidos respecto de la secuencia de NSP5 codificada por el gen 11 del v252.

Las secuencias obtenidas de los segmentos 11 de los distintos aislamientos fueron comparadas con secuencias publicadas del segmento 11 de otros rotavirus grupo A. La secuencia del segmento 11 de los aislamientos virales descritos presenta una alta homología con el segmento 11 de las cepas de rotavirus humanos de "electroferotipo corto" DS-1 (Fig. 4) aislada en Washington (USA) de un niño infectado (Kalica *et al.*, 1978) y RV5 aislada en Australia en 1977 (Albert and Bishop, 1984).

La similitud entre la secuencia del segmento 11 del v252 y de la cepa DS-1 es del 97% y se incrementa a un 98% si se considera únicamente la región codificante (nt 22 al 624).

En la región codificante existen 14 cambios de nucleótidos (12 de los cuales son transiciones), que producen 5 cambios de aminoácidos en la proteína NSP5. Algunos de los cambios en secuencia que presenta el segmento 11 del virus DS-1 respecto al del v252, se corresponden con cambios observados en otros de los aislamientos secuenciados. El incremento de tamaño del segmento 11 de la cepa DS-1 es producido, al igual que en el virus v252, por la inserción de una secuencia rica en AT de 148 nt, que presenta solo 7 cambios de nucleótidos (5 transiciones) respecto a la inserción descrita del v252.

La comparación la secuencia del segmento 11 del v252 con el segmento 11 de la cepa de rotavirus humana 69M de "electroferotipo super-corto", que presenta también un rearrreglo de tipo II, muestra que en este caso la homología es menor. La región codificante del segmento 11 de la cepa 69M presenta homología del 88.4% y una delección de 6 nucleótidos respecto a la secuencia del v252, y codifica para una proteína 2 aminoácidos más corta. El extremo 3' no codificante de ambos segmentos 11 está constituido por una región rica en AT seguida de los 49 nucleótidos terminales del extremo 3' de todos los segmentos 11. La secuencia de los 49 nucleótidos es prácticamente idéntica en ambos virus y la inserción rica en AT de ambos segmentos, si bien es de distinto tamaño (148nt en el v252 y 281nt en el 69M), presenta zonas de alta homología como se muestra en la Figura 6. Este dato sugiere una cierta característica en común en la región 3' no codificante de los segmentos 11 con reordenamientos de tipo II de las cepas 69M y v252. El análisis de las secuencias conservadas en las inserciones de los segmentos que presentan este tipo de reordenamiento podría aportar datos sobre el mecanismo que les dio origen.

El segmento genómico 11 del aislamiento v183 de "electroferotipo normal" presenta una alta homología con el segmento 11 de la cepa de rotavirus humana Wa (97.6% de homología), con solo 8 sustituciones en toda la secuencia (6 transiciones). Al considerar la proteína NSP5, codificada por el gen 11, la homología es menor. La cepa Wa presenta, de acuerdo a la secuencia publicada, una delección después del nucleótido 387 produciendo un corrimiento en el marco de lectura respecto al v183, que se restituye por

```

69M-ATATAAGGTTACTTCGGCATTATACTTGTCACTTATTATAAGTATATAAA

69M-TGTACTGCTTAAATGCTACAAAAACACATTCTTCGATAATATATAAAACA

69M-AAAATGAAGAAGTGTTTAAATTCATTTTCGTTTAAAGTAGGAAACACTACC
   AAAT-----T-T-----TC-T-T--TT-A-----A--C-----
252-AAAAT-----TTTCTGATCACTCTTGTATTATAATTACTAAATATTCACTT

69M-ATTATATAGAAAATAATACACATTATTATTATTATATATATTGAATGTTA
   A-T--A-AGA-AATAA-----T-----ATTATAT-----
252-AATGCACAGATAATAAATGCTATCTA---ATTATAT-----

69M-TTTTACTGTCCTTATATGATGTTAATCTTATGAATTGTAATATAT-----
   -----TGT-----ATG-TAAT-T-----ATT--AATATAT-----
252-----TGT-----ATGATAAT-T-----ATTACAATATATACTGTG

69M--TATTGATTCATAATGAAACAATAATGAGGAAGATTAATA
   TATTGA-T-TAATGA-A--CTAATGAG-GAAGATT-AT-
252-TTATTGAATTATAATGATATCTAATGAGAGAAGATTGATG

69M-Cgtctaacctgggagatcactagggagctccccactcccgttttgtagacc
   Cgtctaacctg-gagatcactagggagctccccactcccgttttgtagacc
252-Cgtctaacctgagagatcactagggagctccccactcccgttttgtagacc

```

**Figura 6: Comparación de la inserción en el segmento 11 de los virus v252 y 69M.**

Se indica en minúscula la región 3' no codificante de 49 nucleótidos presente en todos los segmentos 11 y en mayúscula la secuencia insertada rica en AT de los segmentos 11 de la cepa 69M (281nt) y v252 (148nt).

la inserción de un nucleótido después del nucleótido 414.

#### **4. Proteína NSP5 codificadas por segmentos 11 normales y segmentos 11 reordenados**

En los 6 virus rearmados, al igual que en las cepas DS-1 y RV5, el primer marco de lectura abierto del segmento 11 inicia en el nucleótido 22 y codifica para una proteína de 200 aminoácidos (proteína NSP5). En el aislamiento v183 la proteína codificada es de 197 aminoácidos y en otras cepas de rotavirus de secuencia conocida es de 197 (Wa) o 198 aminoácidos (69M).

La variación observada en el número de aminoácidos de la proteína NSP5 en distintas cepas de rotavirus y en los virus analizados en esta tesis puede ser atribuida a inserciones o deleciones que tienen lugar en una región definida, comprendida entre los aminoácidos 138 y 149 de la proteína viral NSP5 del v252, que corresponde con una región básica de NSP5.

Teniendo en cuenta los residuos altamente conservados en esta región, en la Figura 7 se propone un alineamiento hipotético de los aminoácidos, comparando la composición aminoacídica de esta región en la NSP5 de todas las cepas secuenciadas hasta el momento incluyendo los 7 aislamientos virales descritos en esta tesis.

A pesar de ser una región variable existen residuos altamente conservados mientras que los variables están restringidos a algunos aminoácidos relacionados.



número de residuo	138				143				148			Número total de aa. de NSP5	
por.CN86	K	K	D	-	K	H	R	-	K	H	Y	197	
* por.CC86	K	K	D	-	K	S	R	-	K	H	Y	197	
bov.UK	K	H	D	H	K	S	R	-	K	H	Y	198	
* bov.VMRI	K	A	D	R	K	S	R	-	K	H	Y	198	
por.OSU	K	K	D	-	K	S	R	-	K	H	Y	197	
* por.C60	K	K	D	-	K	S	R	-	K	H	Y	197	
por.YM	K	K	D	-	K	S	R	-	K	H	Y	197	
hum.WA	K	K	D	-	K	S	R	-	K	H	Y	197	
hum.v183	K	K	D	-	K	S	R	-	K	H	Y	197	
*_hum.MC345	K	K	D	-	K	S	R	-	K	H	Y	197	
*_hum.Z10262	K	K	D	-	K	S	R	-	K	H	Y	197	
sim.SA11	K	Q	H	H	K	S	R	-	K	H	Y	198	
* rab.Ala	K	K	D	H	K	H	K	-	K	C	Y	198	
hum.hAA	K	H	E	T	K	H	R	-	K	C	Y	198	
*_hum.69M	K	H	E	T	K	H	R	-	K	C	Y	198	
*_hum.B37	K	H	E	T	K	H	R	-	-	K	C	Y	198
hum.AB	K	-	-	H	K	H	K	Y	K	K	C	Y	198
*_hum.RV5	K	Q	E	H	K	H	K	Y	K	K	C	Y	200
*_hum.DS1	K	Q	E	H	K	H	K	Y	K	K	C	Y	200
*_hum.v61	K	Q	E	H	K	H	H	Y	K	K	C	Y	200
*_hum.v47	K	Q	E	H	K	H	H	Y	K	K	C	Y	200
*_hum.v51	K	Q	E	H	K	H	H	Y	K	K	C	Y	200
*_hum.v158	K	Q	E	H	K	H	K	Y	K	K	C	Y	200
*_hum.v252	K	Q	E	H	K	H	K	Y	K	K	C	Y	200
*_hum.v115	K	Q	E	H	K	H	K	H	K	K	C	Y	200

Figura 7: Comparación de la región variable de NSP5 en distintas cepas de rotavirus grupo A.

Alineamiento hipotético de los aminoácidos de la región comprendida entre los residuos aminoácidos 138 y 149 de la proteína NSP5 de distintas cepas de rotavirus grupo A.

Las flechas indican aminoácidos conservados. Los aminoácidos relacionados se señalan encuadrados.

\* Señala a los rotavirus de electroferotipo corto.

## ***DISCUSSION***

### ***Reordenamientos genómicos en rotavirus***

Los resultados obtenidos en el estudio de rotavirus humanos de "electroferotipo corto", aislados de niños con gastroenteritis aguda, muestran que el cambio en el perfil electroforético de estos virus está dado por un cambio de movilidad del segmento 11. Este cambio de movilidad se debe a un aumento del tamaño del segmento 11 originado por un reordenamiento.

Los reordenamientos genómicos han sido ya descritos en rotavirus de distintas especies. En general los reordenamientos originan un segmento genómico de mayor tamaño que el normal y el rearrreglo no altera la región codificante del gen ni las secuencias y localización de las regiones 5' y 3' no codificantes conservadas para cada segmento. En orbivirus, otro género de la familia Reoviridae, también han sido descritos virus que presentan reordenamientos (Eaton and Gould, 1987), lo cual indica que este mecanismo de variación genómica podría ser general a toda la familia Reoviridae y probablemente está relacionado con sus mecanismos de transcripción y replicación.

Los reordenamientos más frecuentes son los que involucran una duplicación parcial o concatemerización del segmento genómico (Reordenamiento tipo I). Muchos de estos reordenamientos se encontraron en el segmento 11 de varias cepas de rotavirus: cepa Alabama de rotavirus de conejo (Gorziglia *et al.*, 1989), cepa C60 (González *et al.*, 1989) y cepa CC86 (Mattion *et al.*, 1990) de rotavirus porcinos, cepa VMRI (Matsui *et al.*, 1990) y cepa C7/183 (Scott *et al.*, 1989) de rotavirus bovino y cepas MC345 (Kojima *et al.*, 1996) y Z10262 (Palombo *et al.*, 1998) de rotavirus humanos. Otros segmentos en los que se encontró este tipo de reordenamiento son: el segmento 5 de cepas de rotavirus bovino (Tian *et al.*, 1993), el segmento 10 (Ballard *et al.*, 1992) y el segmento 7 (Méndez *et al.*, 1992) en cepas de rotavirus humanos, el segmento 6 de rotavirus ovinos (Shen *et al.*, 1994), entre otros.

Los reordenamientos tipo II, producidos por la inserción de una secuencia rica en A y T, han sido descrito únicamente para el segmento 11 de rotavirus humanos caracterizados

por presentar "electroferotipo corto" (inserción de 148 nt) y "super-corto" (inserción de 281 nt): cepas RV5 y B37 (Nuttall *et al.*, 1989), DS-1 y 69M (Matsui *et al.*, 1990).

Los aislamientos virales de "electroferotipo corto" caracterizados en esta tesis presentan un reordenamiento tipo II, que consiste en la inserción de una secuencia rica en A y T de 148 nucleótidos inmediatamente después del codón de terminación de traducción. Las secuencias del segmento 11 de los 6 aislamientos virales con "electroferotipo corto" analizados son muy similares entre sí, incluso en la región insertada. El porcentaje de identidad a nivel de nucleótidos es mayor del 98,8%, y la mayor parte de los cambios observados corresponden a transiciones C/T o A/G. Por otra parte, el perfil electroforético de los otros segmentos genómicos de estos aislamientos virales es muy similar y todos pertenecen al serotipo G2 característico de rotavirus humanos con "electroferotipo corto". Estos datos sugieren que estos virus se originaron a partir de un mismo virus ancestral y los cambios nucleotídicos observados entre los distintos aislamientos podrían ser debidos a mutaciones acumuladas en la evolución independiente.

Contrariamente, cuando se compara la región codificante del segmento 11 del virus v183 y la misma región de los virus con reordenamientos, provenientes del mismo muestreo epidemiológico, el porcentaje de identidad es del 84%. Considerando la alta conservación a nivel de nucleótidos del segmento 11 de rotavirus (López and Arias, 1993) este porcentaje de similitud es bajo, lo que indica que existe entre ambos una distancia evolutiva considerable. Por otra parte, el v183 pertenece al serotipo G1 y el perfil electroforético de los demás segmentos virales es ligeramente diferente. Es poco probable, por lo tanto, que el virus v183 haya dado origen a los virus con reordenamiento del segmento 11 descritos en esta tesis. No hemos encontrado en los aislamientos virales estudiados ni en la literatura una cepa de rotavirus de "electroferotipo normal" que presente un segmento 11 con características similares a las encontradas en los segmentos 11 estudiados: alta identidad a nivel de nucleótidos y que codifique para una proteína de 200 aminoácidos, que pueda ser considerada como cepa parental.

La comparación de la secuencia del segmento 11 rearrreglado del aislamiento v252 (tomado como modelo de los virus estudiados) con las secuencias de las cepas de

rotavirus humanos de "electroferotipo corto": DS-1, aislada en 1978 en Washington, USA (Kalica *et al.*, 1978; Matsui *et al.*, 1990), y RV5, aislada en Australia en 1977 (Albert and Bishop, 1984; Albert *et al.*, 1987; Nuttall *et al.*, 1989) muestra que la homología es muy alta, con una identidad a nivel de nucleótidos del 97% si se considera todo el segmento y del 98% cuando se considera únicamente la región codificante. El hecho que estos virus hayan sido aislados de niños en lugares tan lejanos como América del Norte, Australia y Argentina, y en aislamientos separados también temporalmente (1977, 1978 y 1983-85) sugiere que el reordenamiento que presenta el segmento 11 de estos virus ha generado una secuencia altamente estable y favorable para ser mantenida y distribuida en el ambiente. La región insertada no contiene ningún marco de lectura abierto y es de suponer que no debería existir presión de selección sobre su secuencia nucleotídica. Sin embargo, contrariamente a lo esperado la comparación de la secuencia del segmento 11 de los distintos aislamientos virales estudiados y de la cepa DS-1 no muestra una acumulación preferencial de cambios en la región insertada (ver Fig.3, *Resultados*). Esta observación coincide con los resultados obtenidos por Blackhall y col. en el pasaje sucesivo de la cepa porcina CC86 en cultivo: la secuenciación del segmento 11 de los distintos pasajes virales (transferencia placa a placa) no muestra que haya una acumulación preferencial de mutaciones en la región duplicada del segmento (Blackhall *et al.*, 1996). Esta alta estabilidad podría indicar que: 1) esta secuencia insertada está de algún modo sujeta a presión de selección, por la presencia de alguna señal que sea seleccionada positivamente, o 2) que este tipo de reordenamiento es un evento frecuente en el que una secuencia específica, de origen no conocido, es insertada en un mismo sitio del segmento 11 de rotavirus que presentan características genéticas particulares, pudiendo suponerse de acuerdo a esta hipótesis que cada virus que presenta esta inserción se originó en un evento independiente .

Los virus estudiados al igual que las cepas RV-5 y DS-1 pertenecen al serotipo G2. Todas las cepas de serotipo G2 descritas en la literatura presentan "electroferotipo corto" (segmento 11 con reordenamiento), lo cual indica un ligamiento genético entre características que corresponden a distintos segmentos genómicos. Probablemente este

segmento 11 reordenado es establemente mantenido en cepas que tienen un base genética determinada.

Otra característica interesante de remarcar del gen 11 de los rotavirus rearrreglados descritos en este trabajo, y de las cepas DS-1 y RV5, es que la proteína NSP5 (codificada por el primer marco de lectura) está compuesta por 200 aminoácidos, y por lo tanto es tres aminoácidos más larga que la codificada por los genes 11 de las cepas Wa humana y OSU porcinas, y dos aminoácidos más que las cepas UK bovina y SA11 de simio. La presencia de estas tres inserciones de aminoácidos solo se encuentra en estas cepas de rotavirus humanos de "electroferotipo corto" mientras que NSP5 de 198 y 197 aminoácidos se encuentran tanto en cepas de "electroferotipo normal" como de "electroferotipo corto". Los tres aminoácidos extra que presenta la proteína NSP5 de estos genes rearrreglados respecto a la cepa Wa podrían ser atribuidos a la inserción de: asparragina (posición 141), tirosina (histidina en el caso de v115) (posición 145) y lisina (posición 146). También presentan una inserción en la posición 141 las NSP5 de 198 aminoácidos de otras cepas de rotavirus: histidina (cepas UK, SA11, Ala), treonina (cepas 69M, B37) o arginina (cepa VMRI). Las inserciones en las posiciones 145 y 146 de la proteína NSP5 no están descritas en la literatura para rotavirus con segmento 11 normal. La inserción de aminoácidos tiene lugar en la región comprendida entre los aminoácidos 138 y 149 de la NSP5 (posiciones referidas a la secuencia aminoacídica del virus v252), que corresponde con una región relativamente variable y básica (López and Arias, 1993). La comparación de esta región de la proteína NSP5 en todas las cepas de secuencias del gen 11 conocidas, muestra que a pesar de ser una región variable, existen posiciones con residuos altamente conservados (lisina en las posiciones 138, 142, y 147, y tirosina en la posición 149), mientras otros sitios presentan cambios restringidos a residuos relacionados (ver Fig.7, *Resultados*).

### ***Mecanismo involucrado en los rearrreglos genómicos***

El mecanismo por el cual se originan reordenamientos en los genes de rotavirus no ha sido aún dilucidado. La existencia de dos tipos de reordenamientos: duplicación e

inserción, implica que existen al menos dos tipos de mecanismos, generados probablemente por errores de la ARN polimerasa viral en el momento de la replicación o transcripción.

Los mecanismos de recombinación intermolecular en la generación de diversidad genética han sido demostrados en un número muy limitado de virus con genoma de ARN. En virus con genoma de ARN cadena+: picornavirus (Kirkegaard and Baltimore, 1986), coronavirus (Makino *et al.*, 1986) y en el virus de planta (brome mosaico virus) (Bujarski and Kaesberg, 1986), la recombinación ocurre durante la replicación, aparentemente por un cambio de templado de la polimerasa viral unida a la cadena de ARN naciente que tiene lugar durante la síntesis de la cadena-. Este mecanismo se denomina "copy-choice". En los virus con genoma a ARN cadena- la recombinación es un fenómeno menos común. En el caso de influenza (virus con genoma segmentado) el salto de la polimerasa viral ("copy-choice") a otro segmento viral genera, por recombinación generalmente no homóloga, un ARN defectivo interferente con estructura de tipo mosaico (Steinhauer and Holland, 1987).

En el caso de los reordenamientos en rotavirus, se ha sugerido que la polimerasa viral podría desprenderse del templado durante la transcripción, continuando la síntesis de la cadena iniciada a partir de un sitio anterior del mismo templado (Hundley *et al.*, 1987) (Tanaka *et al.*, 1988) (Gorziglia *et al.*, 1989) (Matsui *et al.*, 1990). Este mecanismo explicaría los reordenamientos de tipo I, que involucran una duplicación parcial del segmento. En algunos segmentos reordenados, que presentan una duplicación cabeza-cola, se han identificado repeticiones directas en el sitio de reiniciación y en el sitio de recombinación (Ballard *et al.*, 1992; Gorziglia *et al.*, 1989; Kojima *et al.*, 1996; Shen *et al.*, 1994). La presencia de estas repeticiones podría ser un indicio del mecanismo involucrado en el reordenamiento: la RNA polimerasa ocasionalmente pudo desprenderse del templado y reiniciar la transcripción a partir de un sitio idéntico al último transcripto. Sin embargo estas repeticiones no se encuentran presentes en todos los segmentos que presentan duplicaciones, y por lo tanto podría haber más de un mecanismo que las origine. En casi todos los casos secuenciados el salto ocurre después del codón de terminación de la

traducción. Este hecho podría deberse a que es un sitio de recombinación preferencial, o que otros eventos de recombinación en sitios distintos sean seleccionados negativamente porque afectarían la estructura primaria de la proteína NSP5 o la estructura del segmento genómico necesaria para su replicación y empaquetamiento.

El mecanismo que podría dar origen a los reordenamientos tipo II que presenta el segmento 11 de otras cepas de rotavirus humanos de "electroferotipo corto" o "super corto" (aislamientos virales descritos, 69M y DS-1) es menos evidente. Se desconoce el origen de las secuencias ricas en A y T insertadas en estos segmentos 11. Ha sido postulado que tales secuencias podrían haber sido originadas por "tartamudeo" de la polimerasa viral al asociarse a regiones del gen ricas en A y T (Gorziglia *et al.*, 1989). Otra hipótesis postulada es la existencia de un mecanismo de "copy-choice", producido por el salto de la polimerasa a otro punto del segmento 11 de la misma cadena o complementaria, o a otro segmento viral. En el caso de los rearrreglos tipo II, sería necesario suponer dos saltos de la polimerasa viral para explicar que en el extremo 3' se retoma nuevamente la secuencia del segmento viral normal. En los virus analizados la secuencia insertada no tiene una homología aparente con la región codificante del mismo segmento 11 reordenado ni con otros segmentos virales. Sin embargo, la cepa 69M presenta en la inserción una secuencia de 18 nucleótidos idéntica a la secuencia comprendida entre los nucleótidos 446 y 463 de la región codificante del gen 11 de la cepa UK bovina (Matsui *et al.*, 1990) y Wa humana (nt:442-459). Esta característica podría ser un indicio relicto de un posible salto de la polimerasa a otro punto del mismo segmento 11, aunque esta secuencia no es copia exacta de los nucleótidos 446-463 del propio segmento 11 de la cepa 69M.

Las inserciones en el segmento 11 de la cepa 69M y el aislamiento v252 presentan algunas zonas con homología, principalmente en el extremo 3' de la inserción. Ambos segmentos tienen un 94% de identidad en los 70 nucleótidos terminales, que incluyen la región no traducida de 49 nucleótidos presente en todos los segmentos 11. Cuando se compara esta misma región con la secuencia del segmento 11 de otras cepas de rotavirus tipo A, la homología disminuye a un 86% con la cepa bovina UK, a una 79% con las cepas



porcina OSU y de simio SA11, y a un 76% con la cepa Wa humana. Es decir, los segmentos 11 reordenados de los rotavirus analizados en esta tesis y de la cepa 69M, no solo conservan en su extremo 3' los 49 nucleótidos de la región no codificante de todos los segmentos 11 sino que también la homología se extiende a parte de la región codificante. Específicamente, la secuencia GAAGATT de la región codificante (nt 604 a 609 v183) se encuentra en todos los segmentos 11, reordenados o no, en la misma posición respecto al extremo 3'. Esta misma región no se encuentra tan conservada en la región codificante del virus 252 al igual que los otros aislamientos (AAAGATT) ni en la cepa 69M (GAAAATT). La conservación de esta secuencia en el extremo 3' podría estar relacionada con alguna señal importante para la replicación y empaquetamiento del segmento 11.

Queda por determinar el mecanismo que da origen a estas inserciones, aunque se puede suponer que los reordenamientos con inserción de secuencias ricas en A/T podrían compartir parcialmente el mecanismo que da origen a la duplicación de segmentos.

Los reordenamientos genómicos han sido propuestos como otro mecanismo de evolución de los rotavirus, junto con la alta tasa de aparición de mutaciones puntuales característica de virus a ARN y el intercambio de segmentos genómicos (reasociación) de los virus con genoma de ARN segmentado. La importancia de los reordenamientos como mecanismo de evolución en los rotavirus sería cuestionable ya que la mayor parte de reordenamientos descritos hasta el momento en rotavirus no afectan la región codificante del gen. Solamente han sido descritos hasta el momento reordenamientos que afectan la región codificante en el segmento 5 de variantes de rotavirus bovinos, que presentan deleciones y duplicaciones en la proteína codificada por ese gen (NSP1) (Tian *et al.*, 1993). No puede descartarse que la frecuencia de eventos de reordenamiento sea mayor que la observada y que otros eventos no favorables, sean enmascarados por ser seleccionados negativamente.

## **CONCLUSIONES**

- Los rotavirus humanos de "electroferotipo corto", analizados en esta tesis, presentan un reordenamiento en el segmento 11 genómico.
- El reordenamiento del segmento 11 de estos virus es causado por la inserción de una secuencia de 148nt rica en A+T. Esta secuencia se encuentra insertada al final de la región codificante del segmento y antes del inicio de la región 3' no codificante conservada para cada segmento viral.
- La secuencia del segmento 11 de estos virus presenta una alta homología con el segmento 11 de las cepas de rotavirus humanos de "electroferotipo corto" DS-1 y RV5
- La proteína NSP5 codificada por la región codificante del segmento 11 reordenado de estos virus y de las cepas DS-1 y RV5 está compuesta de 200 residuos aminoácidos, es decir que presentan 2 o 3 aminoácidos más que las NSP5 codificadas por el gen 11 de otras cepas de rotavirus tipo A.
- Del estudio realizado no puede inferirse el mecanismo involucrado en el reordenamiento. Sin embargo, la existencia en el extremo 3' de la inserción de algunas regiones con homología entre el segmento 11 de los aislamientos estudiados y la cepa 69M, podría indicar algún mecanismo en común entre ambos reordenamientos.

## **CAPITULO II**

**Estudio de secuencias señales de reconocimiento de la polimerasa viral en rotavirus.**

## **OBJETIVOS**

El objetivo del trabajo que se presenta en este capítulo fue desarrollar un sistema que permita obtener partículas virales recombinantes en Rotavirus, incorporando en el genoma viral un ARN sintetizado *in vitro*. Este ARN exógeno debe tener características análogas a los segmentos virales, de modo de ser reconocido por la maquinaria viral, replicado y empaquetado junto con los otros segmentos genómicos.

Para desarrollar este sistema es necesario por lo tanto estudiar cuál es el sustrato de ARN más indicado para ser incorporado al ciclo replicativo viral y conocer cuáles son las señales implicadas en el reconocimiento de los ARNs virales por los mecanismos de replicación y de empaquetamiento del virus.

El desarrollo de una metodología que permita la obtención de rotavirus recombinantes es importante ya que hasta el momento no es posible modificar específicamente el genoma y hacer genética dirigida en los rotavirus.

Con este objetivo se llevaron a cabo los siguientes estudios:

- Diseño y construcción de segmentos de ARNs análogos al ARN de los segmentos virales de rotavirus.
- Análisis de la incorporación del segmento de ARN exógeno al ciclo replicativo viral.
- Estudio de las secuencias virales mínimas y de las características estructurales del ARN necesarias para su replicación .
- Desarrollo de una línea celular que permita la replicación de virus defectivos del segmento 11 originados como consecuencia del intercambio del segmento viral con un ARN exógeno: línea celular MA104/NSP5.
- Estudio del empaquetamiento del segmento ARN exógeno: Formación de partículas virales recombinantes.

Los interrogantes que se intentan responder con el trabajo realizado en esta tesis son:

- a) cuál es el sustrato de ARN más adecuado para ser incorporado al ciclo replicativo viral: ARN<sub>dc</sub>, análogo al ARN genómico viral, ARN cadena+, análogo al ARN<sub>m</sub>, o ARN cadena-.
- b) cuáles son las señales necesarias para que un ARN exógeno sea reconocido por las enzimas virales y sea replicado.
- c) cuáles son los requerimientos para que un ARN exógeno sea empaquetado en partículas virales.

## **INTRODUCCION**

La manipulación genética de los virus ha servido para introducir modificaciones específicas en los genomas virales y ha aportado información respecto a la función de distintas proteínas virales. La generación de virus recombinantes infectivos posibilita también la obtención de cepas modificadas por ingeniería genética más aptas para ser empleadas como vacunas, y permite también en muchos casos el uso de estos virus como sistema de expresión de proteínas exógenas.

En los virus con genoma de ARNdc segmentado, pertenecientes a la familia Reoviridae (entre ellos los Rotavirus), no se ha logrado hasta el momento obtener partículas virales infectivas que contengan modificaciones específicas introducidas en su genoma por manipulación genética. El desarrollo de una metodología adecuada se dificulta debido a la complejidad de la replicación en los virus de esta familia y fundamentalmente por la falta de conocimiento respecto a las proteínas y secuencias virales involucradas en el reconocimiento del ARN viral por la ARN-polimerasa, tanto en la transcripción como en la replicación del genoma viral, y respecto al empaquetamiento del genoma en las partículas virales.

Las características distintivas de los rotavirus que se tuvieron en cuenta en el diseño de una estrategia para incorporar al genoma viral moléculas de ARN sintetizadas *in vitro* fueron:

1) La replicación del genoma de los rotavirus es citoplasmática. El ARNm viral cadena +, transcrito a partir de las partículas virales, cumple dos funciones en la célula: dirige la síntesis de las proteínas virales y sirve como molde para la síntesis del ARN cadena-, generando segmentos virales de ARNdc. Se desconoce si existe un único conjunto de ARN+ que indistintamente cumpla ambas funciones o si existen dos conjuntos de ARN+ diferenciados funcionalmente por su localización o asociación con distintas proteínas no estructurales. El ARN cadena-, a medida que es sintetizado, queda asociado al ARN+, formando el ARNdc. El ARNdc se encuentra protegido por proteínas que forman las partículas subvirales, lo que hace suponer que el ARNdc es empaquetado co-replicativamente.

2) La característica segmentada del genoma hace a los rotavirus susceptibles de intercambiar segmentos genómicos entre distintas cepas durante infecciones mixtas (reasociación).

3) Los ARN virales presentan secuencias consenso altamente conservadas en sus extremos 5' y 3', comunes a todos los segmentos genómicos y secuencias específicas para cada segmento en las regiones no codificantes. Estas secuencias se suponen involucradas en el proceso de replicación, transcripción y/o empaquetamiento en la partícula viral, aunque no se conocen con exactitud cuales son las señales ni su localización.

Teniendo en cuenta estas características, se pensó que moléculas de ARN análogas a los segmentos virales, sintetizadas *in vitro* e introducidas en el citoplasma de una célula infectada por rotavirus, podrían ser replicadas por las enzimas virales y empaquetadas junto con el genoma viral en nuevas partículas virales. La posibilidad de incorporar al genoma viral ARN sintetizado *in vitro* permitiría introducir nueva información en el genoma del virus.

## ***RESULTADOS***



## **RESULTADOS**

### **1. Diseño y construcción de ARNs análogos del segmento 11**

La estrategia propuesta para obtener rotavirus recombinantes fue incorporar al genoma del virus una molécula de ARN sintetizada *in vitro*. Esta molécula de ARN debe poseer la información mínima necesaria para ser replicada y empaquetada por la maquinaria viral, y algún marcador que permita identificar los virus que hayan incorporado este ARN como nuevo segmento viral. Las señales involucradas en la replicación, transcripción y en el empaquetamiento de los segmentos genómicos virales no se conocen con exactitud, pero se supone que se encuentran en las secuencias no codificantes conservadas de los segmentos virales.

El diseño de estas moléculas de ARN, análogas al genoma de rotavirus, se realizó tomando como base la estructura del segmento 11. Las razones de la elección de este segmento fueron las siguientes : 1) El segmento 11 es el segmento de menor tamaño del genoma viral. Los reordenamientos genómicos descritos en rotavirus, aislados tanto de organismos infectados como obtenidos por infección a alta multiplicidad, pertenecen en su mayor parte a rearreglos en el segmento 11, que podría significar que la incorporación de secuencias extras en este segmento es más fácilmente admitida que en otros, 2) la disponibilidad en el laboratorio del ADNc del segmento 11 de distintas cepas de rotavirus, 3) el interés de generar virus recombinantes que presenten mutaciones específicas en el gen 11 para estudiar las funciones de la proteína codificada: NSP5.

Las construcciones diseñadas para sintetizar las moléculas de ARN análogas al segmento 11 viral se basaron en la estructura del segmento 11 de la cepa OSU (porcina) de rotavirus tipo A. En estas construcciones se conservaron las secuencias de los extremos 5' y 3' no codificantes del segmento 11 y la región codificante del gen 11 fue reemplazada por la región codificante del gen CAT (Cloranfenicol Acetil Transferasa), de modo de tener un marcador para identificar los virus recombinantes en células infectadas (gen "reporter").

La base para todas estas construcciones fue el fragmento **Ro11** sintetizado a partir de los oligonucleótidos **Ro1** y **Ro2** (Fig.8a y Materiales y Métodos). El fragmento Ro11 contiene las secuencias completas de las regiones no codificantes 5' (21nt) y 3' (46nt) del segmento 11 (cepa OSU), separadas por la secuencia de reconocimiento para la enzima BamHI, y un sitio SacII que define exactamente el fin de la secuencia 3' viral.

El fragmento Ro11 fue clonado en el vector de transcripción pT3/SP6, quedando bajo el control del promotor de la ARN polimerasa T3 (Fig. 8d). La región codificante del gen CAT fue clonada en el sitio BamHI (**pT3Ro11/CAT**) (Fig. 8b).

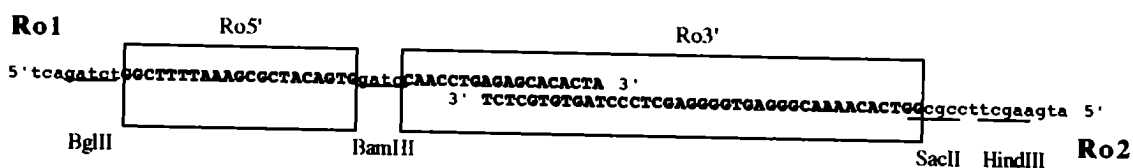
El **ARN Ro11/CAT cadena+**, que contiene la secuencia de la región codificante del gen CAT flanqueada por los extremos 5' y 3' virales (Fig. 8c), fue sintetizado por transcripción *in vitro* del vector **pT3Ro11/CAT** linearizado por digestión con la enzima SacII. El extremo 3' del ARN transcripto *in vitro* se corresponde exactamente al extremo 3' no codificante del ARN mensajero del segmento 11 viral, pero el extremo 5' posee 9 bases extras de origen no viral como consecuencia de la transcripción *in vitro*.

El **ARN Ro11/CAT cadena-** (Fig.9c) fue sintetizado por transcripción *in vitro* del vector **pSP6Ro11/CAT** linearizado por SacII, cuya construcción se detalla en la Figura 9a,b,d y en Materiales y métodos. El ARN Ro11/CAT- es análogo a la cadena- del ARN viral del segmento 11, donde la secuencia complementaria del gen CAT se encuentra flanqueada por las regiones no codificantes del segmento 11. En este caso, el producto de transcripción no contiene en los extremos 5' o 3' ningún nucleótido adicional respecto a la secuencia viral.

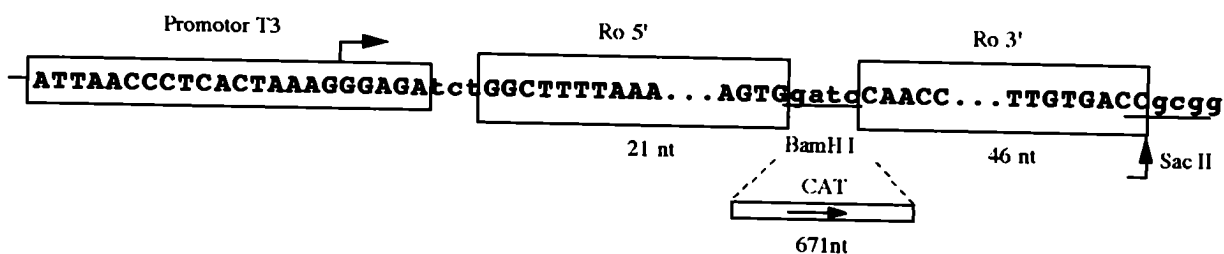
El **ARN doble cadena (dc)**, análogo al ARN<sub>dc</sub> genómico, se obtuvo por desnaturalización por calor y posterior hibridación de cantidades equimoleculares de los ARN Ro11/CAT+ y Ro11/CAT- transcriptos *in vitro*.

Las transcripciones *in vitro* del ARN cadena+ fueron realizadas en presencia del análogo de la estructura cap, 7-metilguanosina(5')trifosfo(5')-guanosina ( $m^7GpppG$ ), de modo de obtener ARN metilado en el extremo 5', análogo al ARN cadena+ viral.

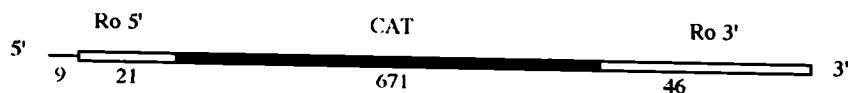
## a) oligonucleótidos Ro1 y Ro2



## b) pT3Ro11/CAT+



## c) ARN Ro11/CAT cadena+

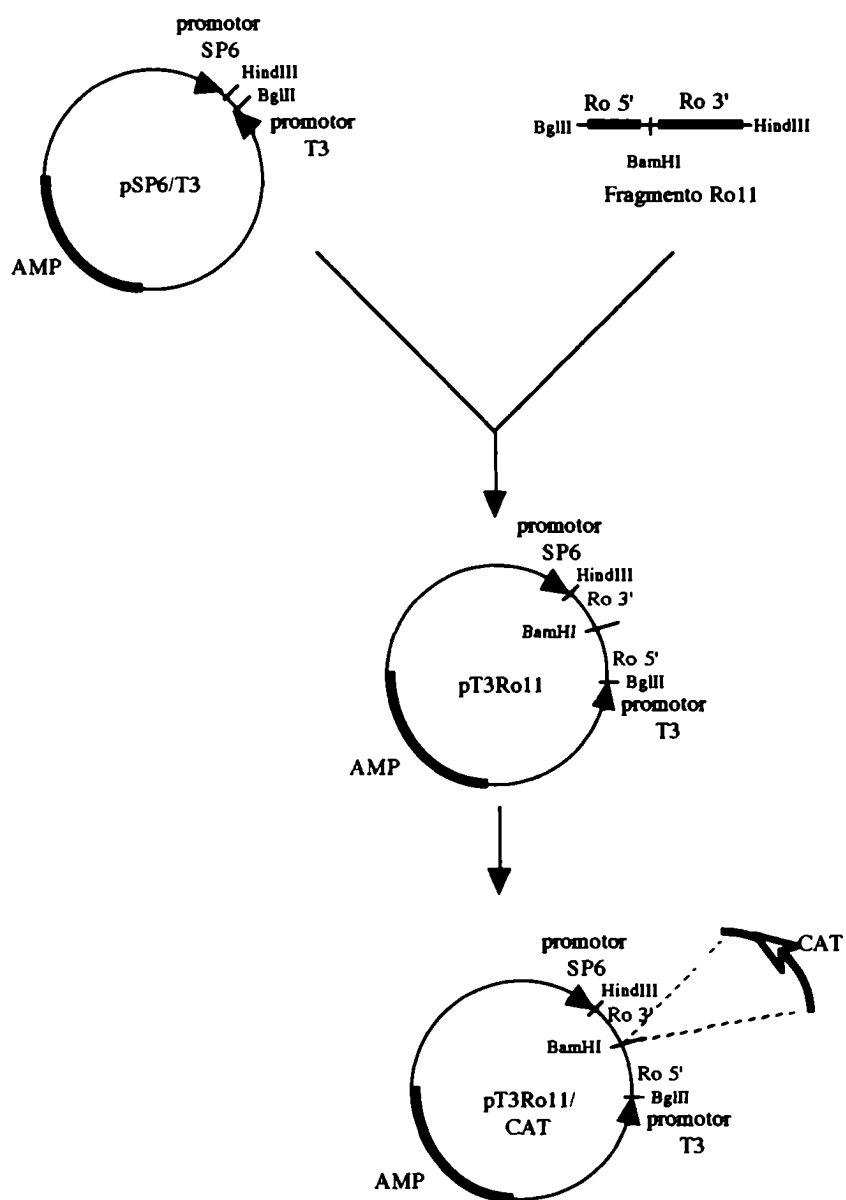


**Figura 8: Representación esquemática del plásmido pT3Ro11/CAT+.**

a) Oligonucleótidos Ro1 y Ro2: Por "annealing" y elongación de estos oligonucleótidos se obtuvo el fragmento de Ro11 que presenta las regiones 5' (Ro5', 21 nt) y 3' (Ro3', 46 nt) no traducidas del segmento 11 de rotavirus (cepa OSU), señaladas en mayúscula y encuadradas. Los sitios de restricción: BglII y HindIII, utilizados para el subclonado del fragmento Ro11 en el plásmido pT3/SP6, y BamHI, para el clonado del gen CAT se indican subrayados.

b) Fragmento del plásmido pT3Ro11/CAT, donde se muestra el promotor T3 fusionado al extremo 5' viral (Ro5'). Las dos secuencias virales Ro5' y Ro3' se encuentran separadas por el gen CAT (región codificante) clonado en el sitio de restricción BamHI. Las flechas indican el sitio de inicio de la transcripción (superior) y el sitio de linearización (inferior) (SacII).

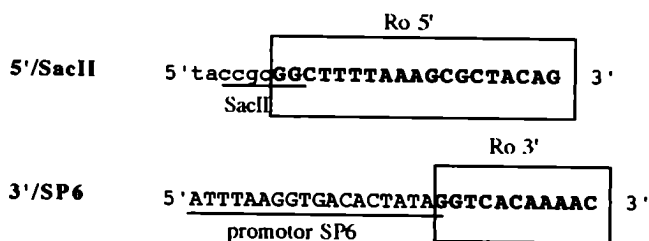
c) ARN Ro11/CAT cadena +, transcripto por la ARN polimerasa T3 a partir del plásmido pT3Ro11/CAT linearizado por SacII.



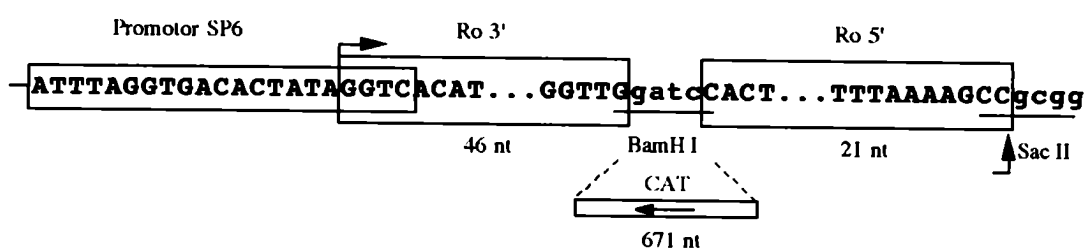
**Figura 8 (cont.)**

d) Esquema del clonado del fragmento Ro11 y del gen CAT en el vector de transcripción pSP6/T3

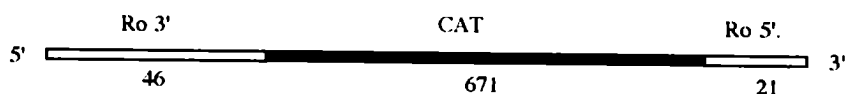
## a) oligonucleótidos 5'/SacII y 3'/SP6



## b) pSP6Ro11/CAT-



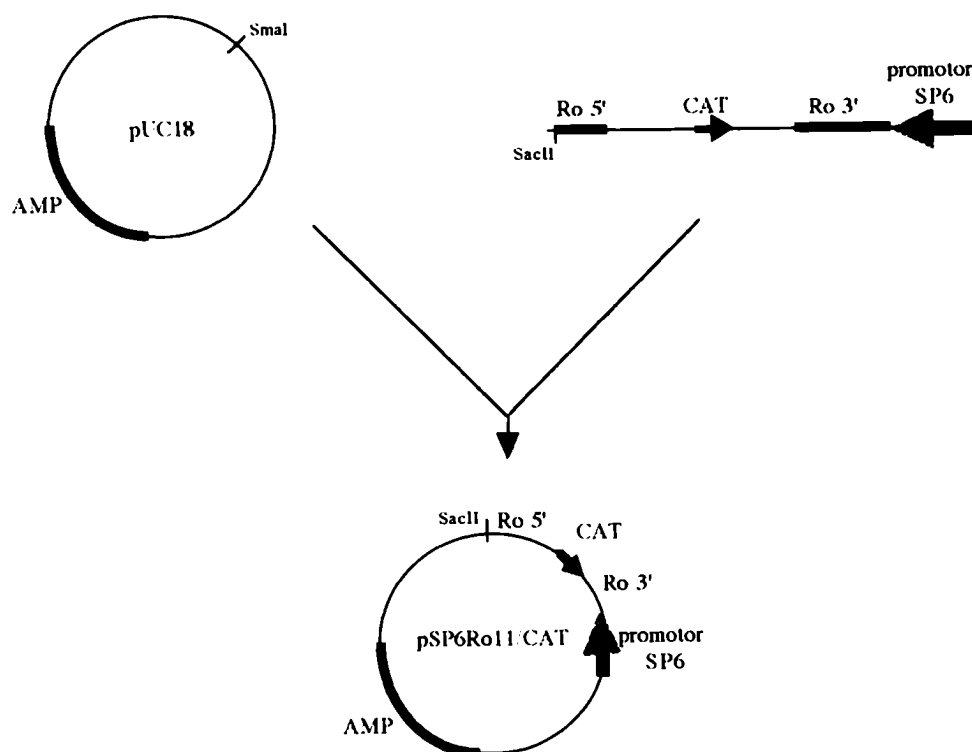
## c) ARN Ro11/CAT cadena-

**Figura 9: Representación esquemática del plásmido pSP6Ro11/CAT-.**

a) Oligonucleótidos 5'/SacII y 3'/SP6: utilizados para amplificar el fragmento SP6 Ro11/CAT- a partir del plásmido pT3Ro11/CAT. La secuencia viral se señala en negrita y encuadrada, y la secuencia del promotor SP6, fusionada y superpuesta a la secuencia del extremo 3' viral cadena -, se indica subrayada.

b) Fragmento del plásmido pSP6Ro11/CAT- donde se indica el promotor SP6 fusionado al extremo 3' viral (Ro3). Las secuencias virales Ro5' (21 nt) y Ro3' (46 nt) cadena - se encuentran separadas por el gen CAT (clonado en el sitio BamHI). Las flechas indican los sitios de iniciación de la transcripción (superior) y de linearización del plásmido (inferior) (SacII).

c) ARN Ro11/CAT cadena -, transcrito por la ARN polimerasa SP6 a partir del plásmido pSP6Ro11/CAT- linearizado por SacII.



**Figura 9 (cont.)**

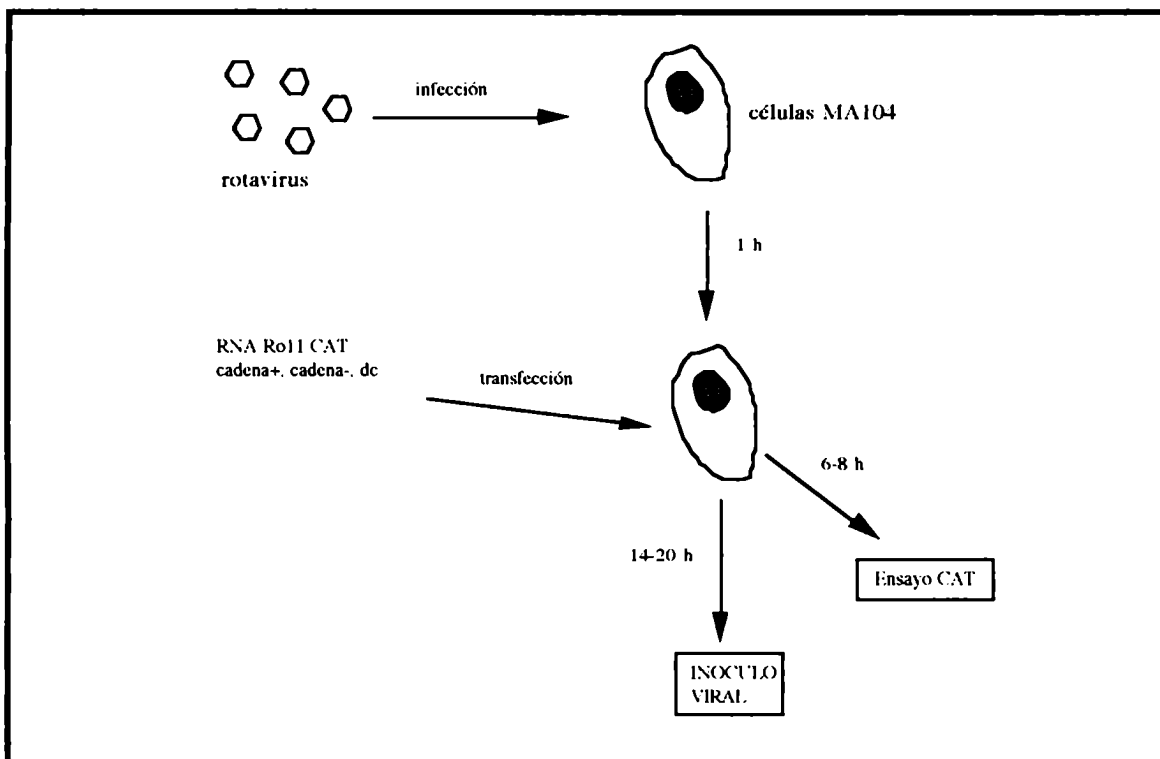
**d)** Esquema del clonado del fragmento SP6-Ro11/CAT- en el plásmido pUC18.

## 2. Incorporación al ciclo replicativo viral de ARNs análogos del segmento 11

Como primer etapa se realizaron ensayos para determinar si los segmentos de ARN exógeno análogos al segmento 11 viral (ARN Ro11/CAT cadena+, cadena- y doble cadena), son incorporados al ciclo replicativo del virus. La incorporación del ARN exógeno al ciclo replicativo viral fue evaluada determinando actividad enzimática CAT en los extractos celulares.

Con este objetivo los distintos ARN/CAT análogos del segmento 11 (sintetizados *in vitro*) fueron introducidos en células infectadas por rotavirus. Según se indica en el esquema de la Figura 10, monocapas de células MA104 fueron infectadas con rotavirus (cepa OSU) y 1 hora post-infección fueron transfectadas con los distintos ARNs: ARN Ro11/CAT cadena+, cadena- y doble cadena. Las células transfectadas fueron incubadas por un período de 8 horas y luego se prepararon extractos proteicos en los que se determinó actividad enzimática de CAT. Los ensayos de actividad CAT fueron realizados según se describe en materiales y métodos, incubando cantidades equivalentes de extractos celulares (correspondientes a 25µg de proteínas totales) en presencia del sustrato de la enzima marcado radiactivamente: C<sup>14</sup>-cloranfenicol. Los productos de acetilación del cloranfenicol fueron resueltos por cromatografía en placa delgada y visualizados por autorradiografía.

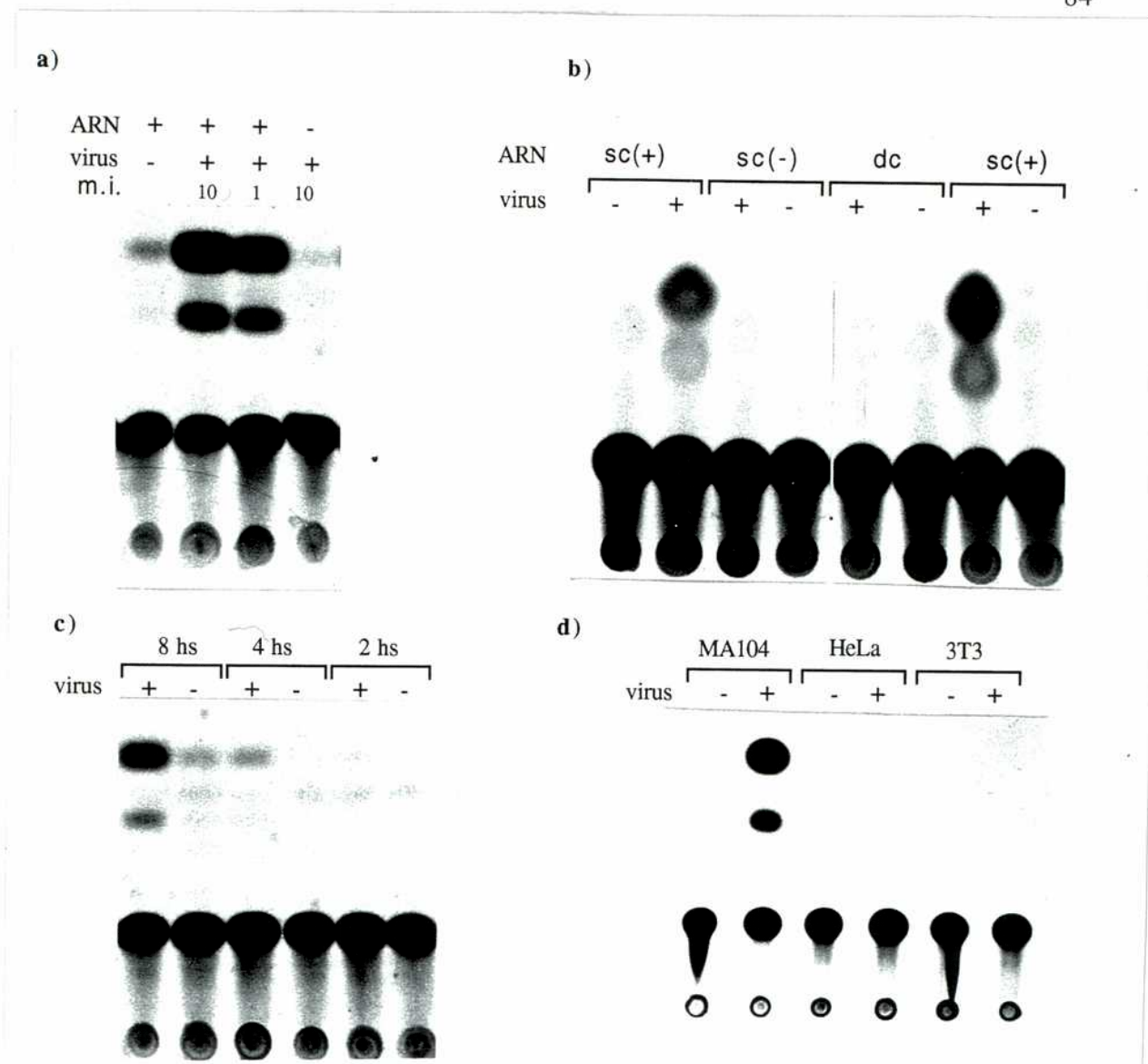
En la Figura 11a se observa que los extractos de células MA104 infectadas con rotavirus no presentan actividad de CAT. Los extractos de células no infectadas y transfectadas con ARN Ro11/CAT cadena+ presentan un nivel basal de actividad CAT, producto de la traducción directa del ARN Ro11/CAT+ que, al ser de polaridad positiva, es sustrato para la traducción (actividad CAT basal). Las células MA104 infectadas con rotavirus (multiplicidad de infección 1 y 10) y transfectadas con el mismo ARN Ro11/CAT+, presentan un nivel de actividad CAT mucho mayor que el nivel basal observado en las células no infectadas.



**Figura 10: Esquema del ensayo de infección-transfección.**

Esquema del procedimiento seguido en el ensayo de infección con rotavirus (cepa OSU) y transfección (ARN análogo al segmento 11) de células MA104.





**Figura 11: Amplificación del ARN Ro11/CAT transfectado en células infectadas por Rotavirus.**

**a)** Células MA104, sin infectar (-) o infectadas (+) con Rotavirus (cepa OSU) a la multiplicidad de infección indicada (m.i.), transfectadas con ARN Ro11/CAT cadena + 1 hora post-infección. La actividad CAT de los extractos fue determinada 8 horas post-transfección.

**b)** Actividad CAT de extractos de células transfectadas 1 hora post-infección (+) o sin infección (-) (líneas 1 a 6), e infectadas (+) o sin infectar (-) 1 hora post-transfección (líneas 7 y 8). Las transfecciones fueron realizadas con ARN Ro11/CAT cadena + (sc(+)), cadena - (sc(-)) y doble cadena (dc).

**c)** Actividad CAT de extractos obtenidos a distintos tiempos post-transfección (ARN Ro11/CAT cadena +), en células previamente infectadas (+) o sin infectar (-).

**d)** Transfección de ARN Ro11/CAT cadena + en células MA104, HeLa y 3T3, previamente infectadas (+) o sin infectar (-).

En la Figura 11b se muestran comparativamente los resultados de la transfección de los distintos sustratos de ARN: cadena+ (sc+), cadena- (sc-) y doble cadena (dc). Los extractos de células transfectadas con ARN Ro11/CAT cadena- (calles 3-4) o ARN Ro11/CATdc (calles 5-6), infectadas o no previamente con rotavirus, no presentan actividad CAT.

El incremento de actividad CAT en células transfectadas con ARN Ro11/CAT+ se observa tanto en células infectadas previamente a la transfección (una hora pre-transfección) (Fig. 11b, calles 1-2) o infectadas posteriormente a la transfección (una hora post-transfección) (Fig. 11b, calles 7-8).

El análisis de la expresión del gen CAT en función del tiempo en células infectadas por rotavirus y transfectadas con ARN Ro11/CAT (Fig.11c) muestra que la actividad CAT aumenta en un modo dependiente del tiempo, siendo ya detectada a las 2 horas post-transfección. La dinámica de acumulación de enzima CAT en el tiempo coincide de esta forma con la síntesis de NSP5 (codificada por el segmento 11 viral) que en células infectadas es detectada ya dos horas postinfección, y continúa su síntesis en el transcurso de la infección, acumulándose en los viroplasmos.

El incremento de la actividad CAT observado en células MA104 infectadas es dependiente de la entrada del virus a la célula y de su replicación (Fig.11d). Distintas líneas celulares no susceptibles a infección por rotavirus (HeLa, 3T3) fueron expuestas a un inóculo activado de rotavirus y posteriormente transfectadas con ARN Ro11/CAT+. Únicamente se detectó incremento de actividad CAT en extractos de células MA104, susceptibles de ser infectadas por rotavirus.

En los ensayos descritos, las células fueron infectadas con la cepa OSU de rotavirus, la misma cepa usada para el diseño del ARN análogo del segmento 11. Para analizar la capacidad de complementación por cepas heterólogas de rotavirus, se realizó el mismo ensayo de transfección infectando las células MA104 con las cepas de rotavirus: C60 (porcina) y SA11 (de simio). Es importante mencionar que las secuencias de las regiones 5' y 3' no codificantes del segmento 11 son altamente conservadas en todas las cepas de rotavirus tipo A (Fig.12).

## a) Región no codificante 5'

	G G C T T T T A A A G C G C T A C A G T G	consenso
	10                                  20	
1	G G C T T T T A A A G C G C T A C A G T G	OSU/11
1	G G C T T T T A A A G C G C T A C A G T G	C60/11
1	G G C T T T T A A A G C G C T A C A G T G	SA11/11
1	G G C T T T T A A A G C G C T A A A G T G	UK/11
1	G G C T T T T A A A G C G C - A T A G T G	WA/11
1	G G C T T T T A A A G C G C T A C A G T G	Ala/11

## b) Región no codificante 3'

	T G A C C T G A G A G C A C A C T A G G G A G C T C C C C A	consenso
	10                                  20                                  30	
619	C A A C C T G A G A G C A C A C T A G G G A G C T C C C C A	Osu/11
1166	C A A C C T G A G A G C A C A C T A G G G A G C T C C C C A	C60/11
622	T G A C C T G G G A A C A C A C T A G G G A G C T C C C C A	SA11/11
622	T G A C C T G A G A G G T C A C T A G G G A G C T C C C C A	UK/11
618	C G A C C T G A G G A C G C A C T A G G G A G C T C C C C A	WA/11
991	T A A C C T G A G A G G T C A C T A G G G A G C T C C C C A	Ala/11

	C T C C C G T T T T G T G A C C	consenso
	40	
649	C T C C C G T T T T G T G A C C	Osu/11
1196	C T C C C G T T T T G T G A C C	C60/11
652	C T C C C G T T T T G T G A C C	SA11/11
652	C T C C C G T T T T G T G A C C	UK/11
648	C T C C C G T T T T G T G A C C	WA/11
1021	C T C C C G T T T T G T C A C C	Ala/11

**Figura 12: Comparación de la secuencia de las regiones 5' y 3' no codificantes del segmento 11 de distintas cepas de Rotavirus tipo A.**

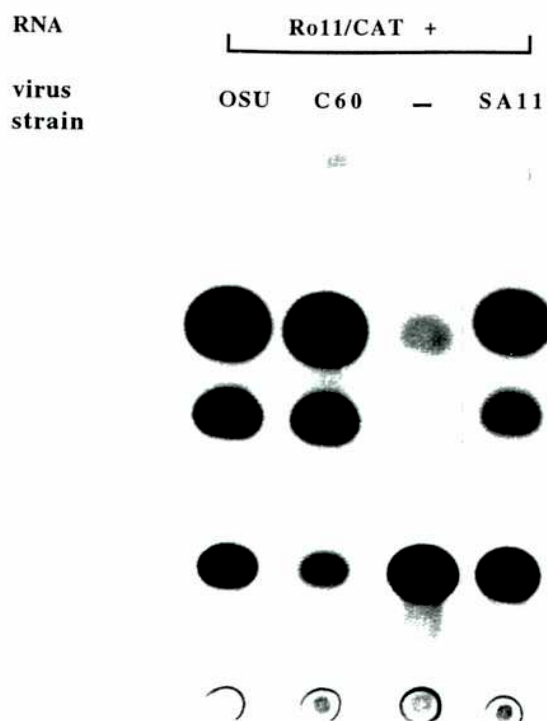
**a)** Región 5' no codificante (21nt), **b)** Región 3' no codificante (46nt).

**OSU y C60:** cepas de rotavirus porcino, **SA11:** cepa de rotavirus de simio, **UK:** cepa de rotavirus bovino, **Ala:** cepa de rotavirus de conejo, **Wa:** cepa de rotavirus humano.

La región 3' no codificante de cepa SA11 presenta algunos cambios respecto a secuencia de la cepa OSU utilizada para el diseño de los ARN análogos al segmento 11, mientras que en la cepa C60 la secuencia de la región 3' es idéntica a la cepa OSU (Fig.12). Las secuencias de las regiones 5' no codificantes de las 3 cepas mencionadas son idénticas. Los resultados del ensayo de complementación con distintas cepas de rotavirus se muestran en la Figura 13. La amplificación de la actividad CAT en las células infectadas con las distintas cepas (OSU, SA11 y C60) y transfectadas con ARN Ro11/CAT+, es independiente de la cepa de rotavirus A utilizada en la infección, ya que no se observan diferencias en el nivel de amplificación de la actividad CAT.

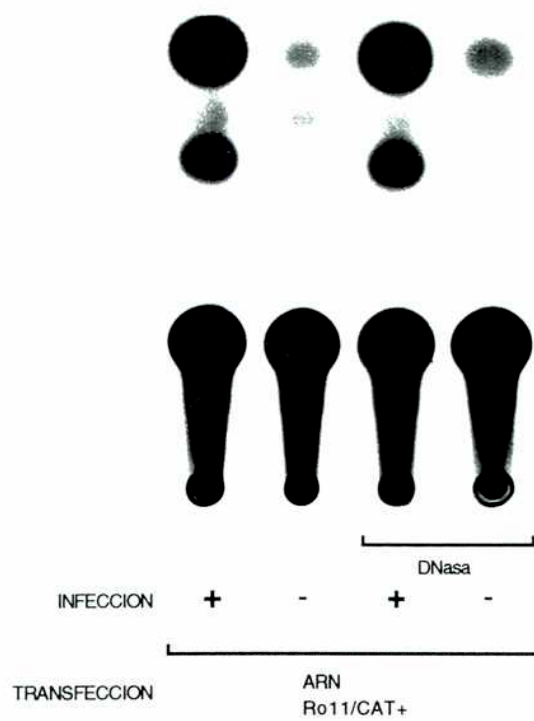
En los ensayos descritos, el ARN sintetizado *in vitro* fue transfectado sin purificar de los otros componentes de la mezcla de transcripción. Para descartar que la actividad CAT observada se deba a algún tipo de transcripción a partir del vector original, inducida por factores virales, se realizaron ensayos tratando previamente la mezcla de transcripción con DNasa. La actividad CAT observada en células transfectadas con ARN tratado con DNasa es equivalente a la que se detecta en células transfectadas con toda la mezcla de transfección (Fig.14), y la amplificación observada depende en ambos casos de la infección viral. Por otra parte células MA104 infectadas con rotavirus fueron transfectadas con los vectores de transcripción (sin transcribir), y no se detectó actividad CAT en los extractos (no se muestra).

Los resultados muestran que en células infectadas con rotavirus y transfectadas con ARN Ro11/CAT+, la actividad de CAT se incrementa significativamente y que este incremento es específico para el ARN Ro11/CAT cadena + ya que no hay actividad CAT en células transfectadas con ARN cadena- o ARN dc. Estos resultados pueden ser interpretados al menos de dos formas a) que la amplificación de la actividad CAT se deba a un incremento del ARN Ro11/CAT cadena+, que significaría que el ARN Ro11/CAT+ fue reconocido por el sistema de replicación viral, y se sintetizó ARNdc que luego actuó como templado para la transcripción de nuevas moléculas de ARN cadena+; o b) que el ARN exógeno fue traducido más eficientemente en células infectadas debido a la presencia de proteínas virales que favorecen su traducción.



**Figura 13: Complementación de la amplificación de CAT por distintas cepas de Rotavirus tipo A.**

Actividad CAT de células MA104 infectadas con distintas cepas de Rotavirus y transfectadas con ARN Ro11/CAT+. Infección con cepa **OSU** (porcina) (línea 1), cepa **C60** (línea 2), **SA11** (línea 4) y control sin infectar (línea 3).



**Figura 14**

Actividad CAT de extractos de células MA104 infectadas(+) o no (-) y transfectadas con toda la mezcla de transcripción del ARN Ro11/CAT (líneas 1 y 2) o con la mezcla previamente tratada con DNasa, fenol-cloroformo y precipitación con etanol (líneas 3 y 4), obtenidos 8 horas post-transfección.

### **3. Estudio de la región 5' y 3' no codificante del ARN cadena+:**

#### **Secuencia promotora de la actividad replicasa de la ARN polimerasa viral**

De acuerdo a los resultados de los ensayos descritos el ARN Ro11/CAT+, que presenta las secuencias de las regiones 5' y 3' no codificantes del segmento 11 de los rotavirus, es reconocido por la maquinaria viral, y este reconocimiento es visualizado por un incremento de la actividad CAT en los extractos de células infectadas y transfectadas. El sistema utilizado en estos ensayos podría ser aplicable para estudiar e identificar las señales requeridas para este reconocimiento.

Las regiones 5' y 3' no codificantes de cada segmento viral en los rotavirus están muy conservadas, aunque difieren entre los distintos segmentos. Por otra parte, los distintos segmentos presentan una secuencia consenso terminal. Las funciones de estas secuencias no se conocen con precisión, pero se supone que proveen señales para la replicación y transcripción, y/o para el empaquetamiento de los segmentos genómicos en las partículas virales, o también pueden participar en la expresión génica. Particularmente, la región 3' no codificante se supone que presenta señales involucradas en la interacción con la ARN polimerasa viral en la replicación de los segmentos virales.

Con el objetivo de identificar las señales presentes en el ARN Ro11/CAT+ que hacen que este ARN exógeno sea reconocido por la maquinaria viral en células infectadas por rotavirus, se sintetizaron distintos ARN/CAT en los que las secuencias de los extremos virales no codificantes fueron modificadas por delección, inserción o mutación. La eficiencia de traducción de estos ARNs fue analizada en un sistema de traducción *in vitro* y su capacidad de ser reconocidos por la maquinaria viral fue evaluada, como en los ensayos anteriores, determinando actividad CAT en los extractos de células infectadas-transfectadas.

#### ***Construcción de ARNRo11/CAT+ con mutaciones en los extremos 3' y 5'***

Todos los ARNs fueron sintetizados por transcripción *in vitro* a partir de vectores o de fragmentos de ADN obtenidos por PCR. Las construcciones se realizaron a partir del vector pT3Ro11/CAT+ por modificación de la región que corresponde al extremo 3'

viral (Fig.15a), o alternativamente, por delección de la región que corresponde al extremo 5' viral (Fig.15b) (materiales y métodos).

Los ARNs **Ro11/CAT $\Delta$ 46** y **Ro11/CAT $\Delta$ 25** poseen delecciones del extremo 3' viral, que involucra en el ARN  $\Delta$ 46 toda la región 3' no codificante viral (46 nucleótidos) y en el ARN  $\Delta$ 25 los últimos 25 nucleótidos del extremo 3' viral.

El ARN **Ro11/CAT(+9)** contiene 9 nucleótidos extras no virales inmediatamente a continuación de los 46 nucleótidos de la región 3' no codificante viral, y fue obtenido por transcripción del plásmido pT3/Ro11CAT linearizado por HindIII.

En el ARN **Ro11/CAT 3'm** los últimos 7 nucleótidos de la región 3' no codificante viral fueron mutados, cambiando la secuencia consenso común a todos los segmentos virales de rotavirus (U(G/U)(U/G)(G/U)(A/G)CC 3'), que en el caso del segmento 11 de la cepa OSU es UGUGACC 3' por la secuencia: GCACCAA 3'.

El ARN **Ro11/CAT $\Delta$ 5'** presenta una delección de la secuencia completa de la región 5' no codificante viral, manteniendo los 9 nucleótidos de origen no viral presentes en el ARN Ro11/CAT+ (producto de la transcripción *in vitro*) previos al codón de iniciación del gen CAT.

### ***Traducción in vitro***

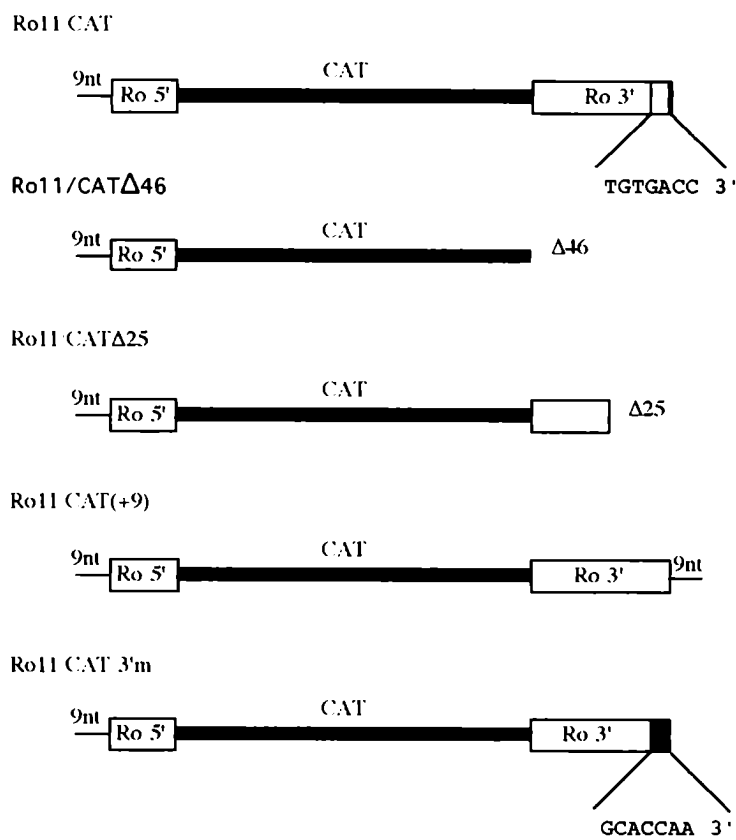
Para determinar si la presencia de las distintas secuencias en el extremo 3' o la ausencia de la secuencia 5' viral tienen algún efecto en la traducción de estos ARN en ausencia de proteínas virales, los ARNs fueron traducidos *in vitro* en un sistema de lisado de reticulocitos (Materiales y métodos). La traducción se realizó en presencia de <sup>35</sup>S-metionina y los productos de traducción fueron resueltos en gel de acrilamida (12%) y visualizados por autorradiografía. En todos los casos se obtuvo un único producto de traducción del tamaño esperado (aproximadamente de 26 kDa) (Fig.16).

No se observa una diferencia cuantitativa significativa en el nivel de traducción *in vitro* de los distintos ARNs en ausencia de proteínas virales, lo que indica que: 1) el extremo 3' viral no tiene un efecto de intensificador ("enhancer") de la traducción, ni incrementa por sí solo la estabilidad del ARN, y 2) la secuencia 5' no incrementa la traducción del ARN viral.



### Estructura de ARN análogos del gen 11

#### a) mutaciones del extremo 3'



#### b) mutaciones del extremo 5'

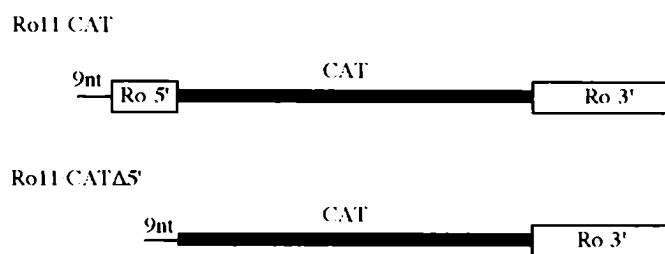
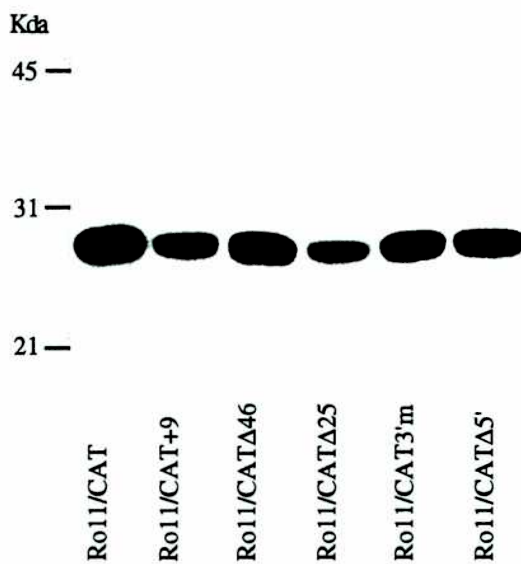


Figura 15: Representación esquemática de distintos ARN Ro11/CAT+ con mutaciones en el extremo 3' y 5'.



**Figura 16:** Traducción "in vitro" de distintos ARN análogos del segmento 11.

Proteína CAT sintetizada "in vitro" en sistema de lisado de reticulocitos en presencia de  $^{35}\text{S}$ -metionina, usando como templado cantidades equivalentes de ARN Ro11/CAT+ y ARNs con distintas mutaciones del extremo 3' y 5'. Cantidades equivalentes de extracto fueron resueltos en PAGE y la proteína sintetizada fue visualizada por autorradiografía.

### ***Actividad CAT en células infectadas-transfectadas***

Los distintos ARN/CAT descriptos fueron analizados en ensayos de transfección en células infectadas por rotavirus.

Los resultados de los ensayos de transfección de los distintos ARNs en células infectadas por rotavirus se muestran en la Figura 17. La actividad de enzima CAT de cada extracto celular se expresa como el porcentaje de conversión del  $^{14}\text{C}$ -cloranfenicol a sus productos acetilados (cpm de los productos acetilados/ cpm total) (Fig.17) y se resumen en la Tabla N°2.

**TABLA N°2**

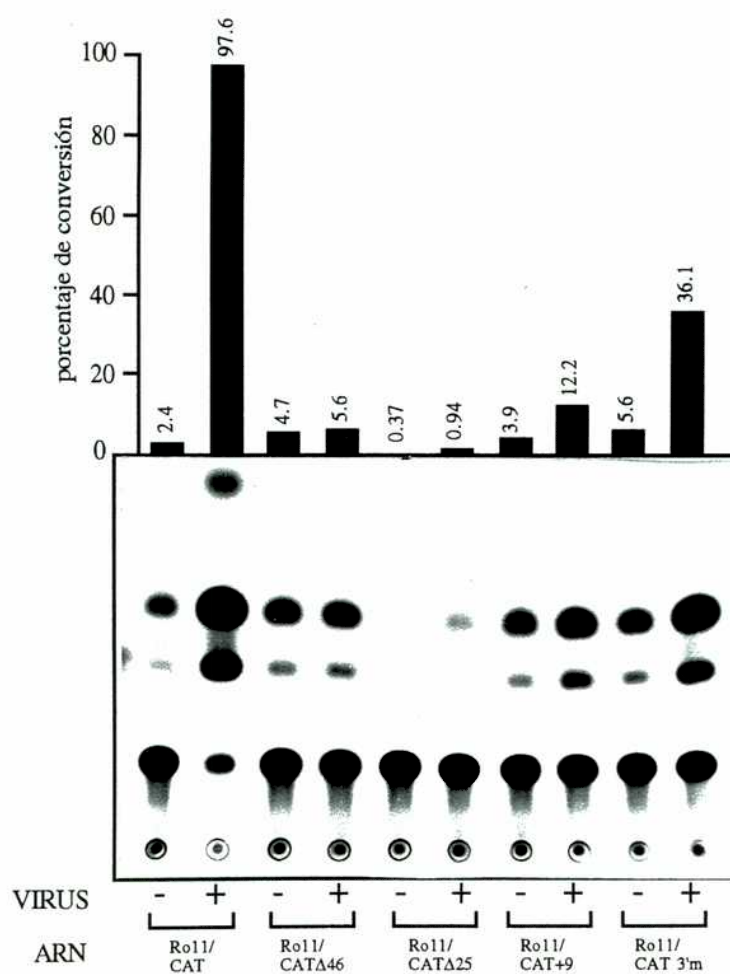
a)

ARN	% de conversión (ACTIVIDAD CAT)		
	- VIRUS	+ VIRUS	incremento
Ro11/CAT	2.4	97.6	95.2
Ro11/CAT $\Delta$ 46	4.7	5.6	0.9
Ro11/CAT $\Delta$ 25	0.4	0.9	0.5
Ro11/CAT+9	3.9	12.2	8.3
Ro11/CAT3'm	5.6	36.1	30.5

b)

Ro11/CAT	1	65	64
Ro11/CAT $\Delta$ 5'	0.5	5	4.5

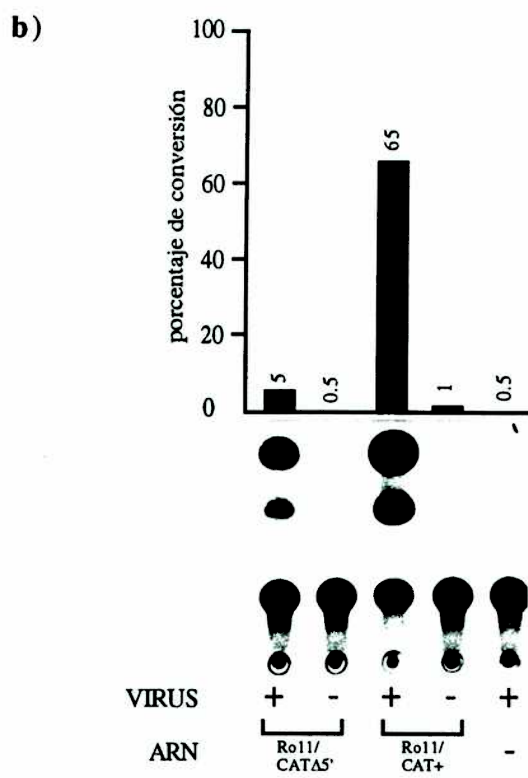
Como se observa en la Figura 17a y en Tabla N°2a, en las células infectadas transfectadas con las distintas variantes de ARN Ro11/CAT+ con mutaciones en la secuencia de la región 3' no codificante viral, el incremento de actividad CAT es en todos los casos significativamente menor que el observado en células infectadas y transfectadas con ARN Ro11/CAT+ (secuencia 3' completa del ARN viral).



**Figura 17: Amplificación de ARNs/CAT análogos del segmento 11 mutados.**

Autorradiografía y cuantificación de la actividad CAT de extractos de células MA104 infectadas (+) o sin infectar(-) y transfectadas con los ARNs/CAT análogos del segmento 11 con distintas mutaciones. La actividad CAT, indicada en el gráfico superior, está expresada como porcentaje de conversión de  $^{14}\text{C}$ -cloramfenicol, y los valores corresponden a un promedio de los datos obtenidos en 3 ensayos independientes.

**a) mutaciones en el extremo 3'**



**Figura 17 (cont.)**

**b) delección del extremo 5'.**

En las células transfectadas con los ARN/CAT que presentan delección total de la secuencia 3' viral: ARN Ro11/CAT $\Delta$ 46, o parcial: ARN Ro11/CAT $\Delta$ 25, no se observaron diferencias significativas entre la actividad CAT detectada en células no infectadas (actividad CAT basal) y en células infectadas con rotavirus (5.6% de conversión respecto a 4.7% para el ARN Ro11/CAT $\Delta$ 46 y 0.9% respecto a 0.4% para el ARN Ro11/CAT $\Delta$ 25), por lo tanto, no se observó incremento de la actividad CAT como consecuencia de la infección viral.

Las células transfectadas con el ARN Ro11/CAT(+9), que presenta 9 bases heterólogas en el extremo 3' de la secuencia viral completa, presentaron una leve diferencia de actividad CAT con y sin infección viral (12.2% de conversión en células infectadas respecto a 3.9% en células no infectadas).

En las células transfectadas con el ARN Ro11/CAT3'm (últimos 7 nucleótidos correspondientes a la secuencia consenso de todos los segmentos virales mutados), también se observó un incremento de actividad CAT como consecuencia de la infección viral (36.1% de conversión en células infectadas respecto al 5.6% basal). También en este caso, el incremento de actividad como consecuencia de la infección viral es mucho menor al observado en células transfectadas con el ARN Ro11/CAT+.

Para analizar si la secuencia de la región 5' no codificante viral, es requerida para la amplificación de CAT observada en células infectadas transfectadas, se midió actividad CAT en células infectadas o no, transfectadas con el ARN Ro11/CAT $\Delta$ 5' (delección completa de la secuencia del extremo 5' viral). Los resultados (Fig.17b, Tabla N°2b) muestran que hay incremento de actividad CAT en células infectadas-transfectadas respecto a células únicamente transfectadas (5% de conversión respecto a 0.5% basal), pero también en este caso es mucho menor al observado para el ARN Ro11/CAT+. Por lo tanto, la delección completa de la secuencia del extremo 5' viral disminuye notoriamente la amplificación de actividad CAT en células infectadas respecto a la observada con el ARN Ro11/CAT+, pero no la elimina como en el caso de las delecciones del extremo 3'.

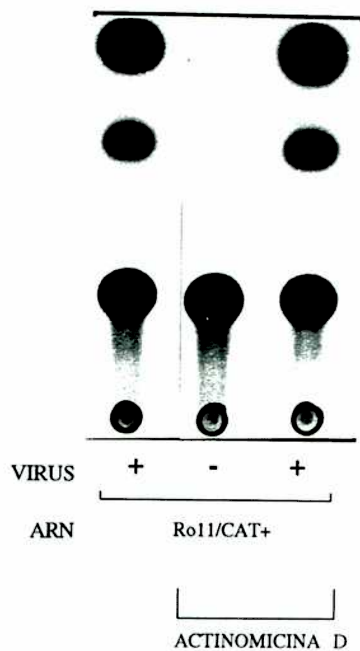
Por otra parte, los valores basales de actividad CAT en extractos de células no infectadas y transfectadas con los distintos ARN Ro11/CAT muestran que la traducción del ARN

transfectado en ausencia de infección viral fue aproximadamente igual en todos los casos, con variaciones que oscilan entre un porcentaje de conversión del 0.4% al 5%. Aunque existen variaciones en los valores de actividad CAT obtenidos en distintos ensayos para un mismo ARN, los valores basales (sin infección) se mantiene siempre en niveles inferiores al 5% de conversión. Este resultado concuerda con los resultados obtenidos por traducción *in vitro*, y por lo tanto demostraría que en ausencia de infección la eficiencia de traducción "in vivo" de los distintos ARNs estudiados es similar.

### ***Transfección en presencia de un inhibidor de transcripción celular (Actinomicina)***

La infección por rotavirus produce una inhibición de la síntesis de proteínas celulares ("shut-off"). El incremento en la actividad CAT observado en células infectadas y transfectadas podría deberse simplemente a una mayor eficiencia de traducción del ARN exógeno, producida como consecuencia de la inhibición de la traducción de los ARNm celulares (poly (A)+). Para determinar esta posibilidad se trató a las células infectadas-transfectadas con actinomicina D, inhibidor de la ARN polimerasa celular pero no de las polimerasas virales, y que por lo tanto inhibe la síntesis del ARNm celular sin afectar la transcripción ni la replicación viral.

Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento previo con actinomicina D de las células transfectadas no infectadas, no induce un incremento de actividad CAT respecto de células no tratadas (Fig.18, calle2). Por otro lado, la actinomicina D no interfiere con el incremento de actividad normalmente observado en células infectadas (Fig.18, calles 1 y 3).



**Figura 18: Efecto de Actinomicina D en la amplificación del ARN Ro11/CAT+.**

Actividad CAT en células MA104 infectadas (+) o sin infectar (-), transfectadas con ARN Ro11/CAT+, tratadas o no con Actinomicina D desde 1 hora antes de la infección hasta la preparación del extracto celular.



El análisis de los resultados obtenidos sugiere que la región 3' no codificante del segmento 11 viral está directamente relacionada con el incremento de actividad CAT observado en las células infectadas transfectadas con ARN Ro11/CAT+, ya que esta amplificación no se observa cuando el ARN transfectado tiene deletado el extremo 3' en forma total (ARN Ro11/CAT $\Delta$ 46) o parcial (ARN Ro11/CAT $\Delta$ 25). La deleción del extremo 5' disminuye el nivel de amplificación de CAT, pero no lo elimina totalmente como ocurre con las deleciones del extremo 3'. Los últimos 25 nucleótidos de la región 3' no codificante del ARN Ro11/CAT+, deben incluir por lo tanto una señal indispensable para la amplificación de CAT. Una de las señales importantes localizadas en la región 3' no codificante de todos los segmentos de rotavirus es la secuencia de reconocimiento para la replicasa viral, requerida para iniciar la síntesis de la cadena-. La región propuesta en la literatura para el reconocimiento de la replicasa viral es la comprendida por los 7 últimos nucleótidos de la región 3' no codificante, que corresponde a la secuencia consenso presente en todos los segmentos virales. La deleción de los últimos 25nt de la región 3' viral estaría eliminando la señal de reconocimiento de la polimerasa viral, imposibilitando la replicación del ARN exógeno. Se puede plantear por lo tanto una correlación entre presencia de señales requeridas para la replicación y amplificación de actividad CAT en células infectadas, que sería consistente con la hipótesis planteada de que la amplificación observada se debe a un aumento del ARN CAT+.

La mutación de la secuencia consenso presente en todos los segmentos virales (últimos 7 nucleótidos de la región 3' no codificante) (ARN Ro11/CAT3'm), si bien disminuye el incremento de actividad CAT observado en células infectadas, no elimina completamente la amplificación de CAT en células infectadas. Esto indicaría que la secuencia consenso no es indispensable y que existe otra señal: secuencia o estructura, presente en los últimos 25 nucleótidos, que también participa en el reconocimiento. La localización de las señales de reconocimiento es también importante, ya que el agregado de 9 nucleótidos en el extremo 3', dejando intactas las secuencias virales, disminuye la amplificación, siendo su efecto más importante que la mutación de las últimas 7 bases.

#### **4. Replicación del ARN exógeno: Detección y caracterización del ARN sintetizado "in vivo"**

De acuerdo a la hipótesis propuesta, la amplificación de la actividad CAT observada en células infectadas y transfectadas con el ARN Ro11/CAT+ correspondería a un aumento en el ARN Ro11/CAT+ transfectado. Este incremento indicaría indirectamente que al menos parte del ARN Ro11/CAT+ transfectado fue transformado en ARNdc por la maquinaria viral, y luego transcrito produciendo nuevas moléculas de ARN cadena+.

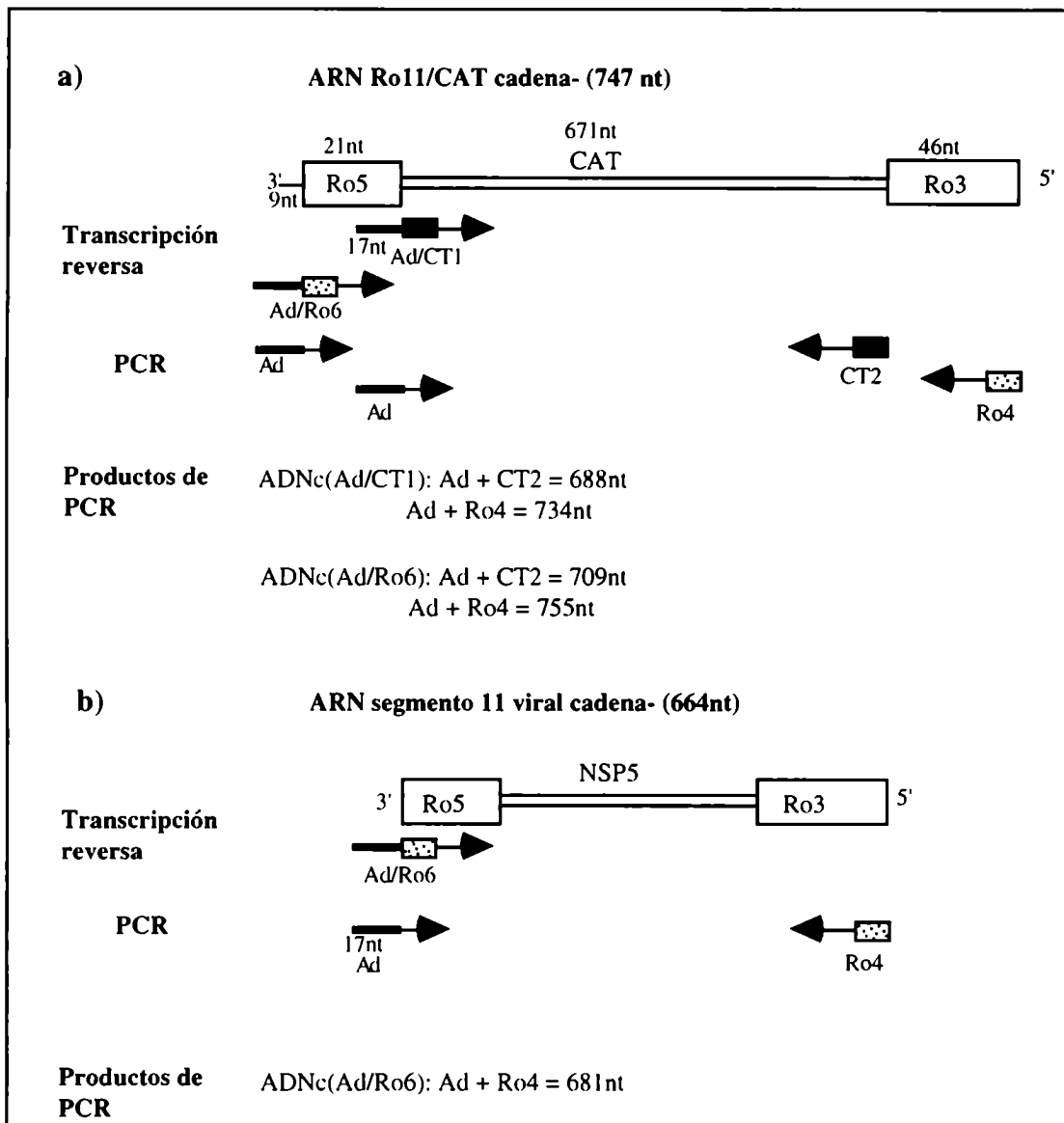
Una forma de confirmar que en células infectadas el ARN exógeno es replicado por la maquinaria viral sería detectar la presencia de ARN Ro11/CAT cadena- o dc.

Con el objetivo de identificar la presencia de ARN cadena- en células infectadas y transfectadas se realizó un *northern-blot* con ARN total purificado de células infectadas y transfectadas, usando como sonda específica el ARNCAT cadena+ sintetizado in vitro en presencia de  $\alpha^{32}\text{P}$  UTP. En los ensayos de *northern-blot* no se detectó ninguna banda específica correspondiente al ARN Ro11/CAT cadena-.

También se realizaron ensayos con el objetivo de detectar el ARN Ro11/CATdc. En estos ensayos las células transfectadas fueron infectadas con la cepa de rotavirus C60 que presenta un segmento 11 de tamaño mayor que el segmento 11 normal, y por lo tanto diferenciable en gel de acrilamida del ARN Ro11/CATdc. El ARN doble cadena purificado de células infectadas y transfectadas fue resuelto en gel de acrilamida (gel de Laemmli) y visualizado por tinción con plata (Materiales y métodos) o por autorradiografía en el caso de células infectadas-transfectadas en presencia de  $^{32}\text{P}$  inorgánico (Materiales y métodos). En ninguno de los casos se detectó la banda correspondiente al segmento exógeno de ARN dc replicado por el virus.

##### **a) Detección de ARN cadena- por Transcripción Reversa/PCR**

La detección del ARN Ro11/CATcadena-, sintetizado en las células infectadas-transfectadas, se realizó por RT/PCR. La localización de los oligonucleótidos utilizados en la transcripción reversa y en la PCR se indican en la Figura 19, y sus secuencias en Materiales y Métodos.



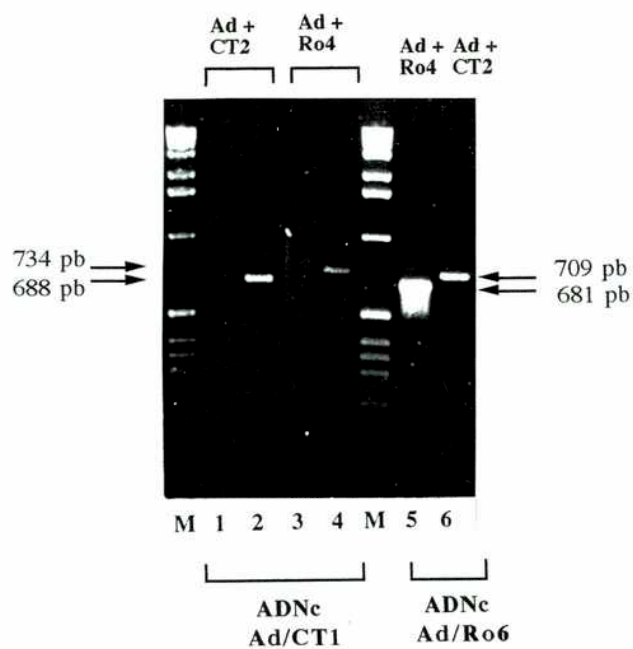
**Figura 19. Esquema y localización de los oligonucleótidos usados en la transcripción reversa y PCR**

El ARN total extraído de células infectadas y transfectadas (ARN Ro11/CAT+), o únicamente transfectadas, 8 horas post-transfección fue retrotranscrito y amplificado. En las reacciones de transcripción reversa se incluyeron alternativamente dos oligonucleótidos complementarios al ARN Ro11/CAT-: **Ad/CT1** y **Ad/Ro6** (Materiales y Métodos) con una secuencia adaptadora en el extremo 5'. El oligonucleótido Ad/CT1 es complementario a la cadena - del gen CAT. El oligonucleótido Ad/Ro6 es complementario al extremo 3' de la cadena- del ARN Ro11/CAT, que corresponde a la región 3' no

codificante viral, y por lo tanto el ADNc sintetizado puede provenir tanto de la cadena- del segmento 11 viral como de la cadena - del ARNCAT transfectado.

El producto de transcripción reversa fue amplificado por PCR con el oligonucleótido adaptador (secuencia 5' de los oligonucleótidos Ad/CT1 y Ad/Ro6) y un segundo oligonucleótido específico del gen CAT (**CT2**), o del extremo 3' no codificante del segmento 11 viral (**Ro4**). El uso del oligonucleótido adaptador permite evitar la amplificación de vestigios del vector de transcripción.

Los productos de la PCR fueron resueltos en gel de agarosa y revelados por tinción con bromuro de etidio (Fig.20). Las calles 1-4 de la Figura 20 b corresponden a los productos de amplificación del ADNc sintetizado con el oligonucleótido Ad/CT1. Los productos de amplificación obtenidos corresponden a los tamaños esperados indicados en la Figura 19a: 688pb para el par de oligonucleótidos Ad + CT2 (Fig.20, calle 2) y 734 pb para el par Ad + Ro4 (Fig.20, calle 4). No hay producto de amplificación, a partir de ADNc proveniente de células no infectadas y transfectadas con ARN Ro11/CAT+ (Fig.20, calles 1 y 3). En las calles 5 y 6 de la Figura 20 se muestran los productos de amplificación del ADNc sintetizado con el oligonucleótido Ad/Ro6 a partir del mismo ARN de células infectadas y transfectadas. La amplificación de este ADNc con el par de oligonucleótidos Ad+Ro4 debería resultar en dos fragmentos, uno correspondiente al segmento 11 viral (de 681pb) y el otro correspondiente al ARN Ro11/CAT cadena- (de 755pb) (Fig.19). Como se observa en la calle 5 (Fig.20), se obtuvo un único producto de amplificación que corresponde al tamaño esperado para el segmento 11 viral (681pb). Este resultado podría deberse a que la presencia del ADNc viral en gran cantidad desplaza competitivamente la amplificación del ADNc proveniente del ARN Ro/11CAT cadena-. Cuando el mismo ADNc es amplificado con un par de oligonucleótidos exclusivos del ARN exógeno (Ad+CT2) se observa una banda de mayor tamaño (Fig.20, calle 6) correspondiente a la esperada para el ARN Ro11/CAT cadena- sintetizado "in vivo" (banda esperada 709pb).



**Figura 20: Productos de RT/PCR**

Los productos de RT/PCR a partir de ARN total de células infectadas y transfectadas (Ro11/CAT cadena+) (calles 2, 4, 5 y 6) o únicamente transfectadas (calles 1 y 3) fueron resueltos en gel de agarosa 1.5% y visualizados por tinción con bromuro de etidio.

La transcripción reversa se realizó utilizando como iniciador el oligonucleótido Ad/CT1 (calles 1, 2, 3 y 4) o Ad/Ro6 (calles 5 y 6).

Las amplificaciones fueron realizadas con los pares de oligonucleótidos: Ad+CT2= calles 1, 2 y 6 y Ad+Ro4= calles 3, 4 y 5

M= marcador de peso molecular 1Kb

Estos resultados indican la presencia de ARN Ro11/CAT- en células infectadas y transfectadas. Por lo tanto, confirmaría que el ARN exógeno, análogo al segmento 11, es reconocido por proteínas virales y usado como templado para la síntesis de ARN cadena- en células infectadas con rotavirus.

#### **b) Estudio de la región 5': primer extension**

En diversos virus, en los cuales el ARN viral sintetizado *in vitro* es infeccioso al ser transfectado en células susceptibles, se ha verificado que durante la replicación o transcripción viral intracelular las secuencias extravirales de los extremos 5' y 3' provenientes de la transcripción *in vitro* son removidas, de modo que la progenie viral posee las mismas secuencias terminales que el virus tipo salvaje (Eggen *et al.*, 1989). El ARN Ro11/CAT+, usado en los ensayos de transfección -infección, posee 9 bases extra en el extremo 5'. Podría suponerse que durante la replicación (producción de cadena-) y transcripción (amplificación del ARN +) el ARN exógeno sea reparado de modo que el ARN sintetizado intracelularmente no presente estos nucleótidos de origen no viral.

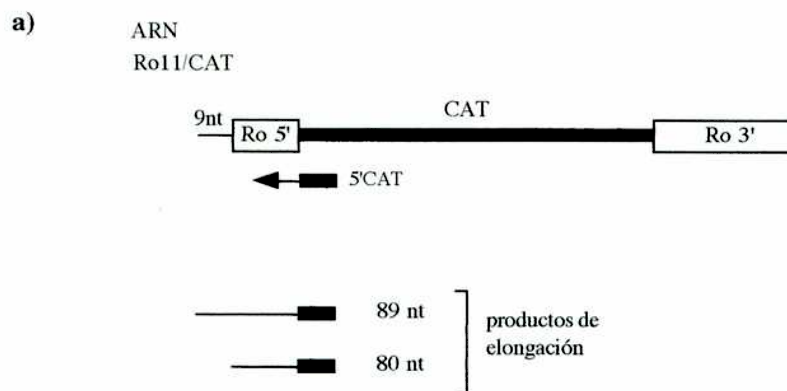
Para caracterizar el ARN cadena+ sintetizado dentro de la célula a partir del ARN transfectado, se realizó un ensayo de extensión a partir de un oligonucleótido iniciador (*primer extension*) que permite diferenciar poblaciones de ARN viral que difieran en la longitud de su extremo 5'. Este ensayo permitiría distinguir el producto de elongación del extremo 5' del ARN+ reparado por el sistema de replicación viral (80 nucleótidos) del producto de elongación del ARN+ transfectado (89 nucleótidos) (Fig.21a). Se utilizó como sustrato ARN total extraído 8 horas post-transfección de células infectadas y transfectadas o transfectadas sin infectar. Las células fueron transfectadas con ARN Ro11/CAT+ o ARN Ro11/CAT $\Delta$ 25 según se indica en la Figura 21b. El ARN Ro11/CAT $\Delta$ 25 fue incluido como un control negativo, ya que los resultados de los ensayos anteriores (estudio de los requerimientos del extremo 3') indican que este ARN no es amplificado en células infectadas. Se utilizó como iniciador (*primer*) el oligonucleótido 5'CAT (5'ACGATGCCATTGGGATATATC3') complementario al

extremo 5' del gen CAT cadena+ (nucleótidos 34 al 54) marcado en el extremo 5' con  $^{32}\text{P}$   $\gamma\text{ATP}$ .

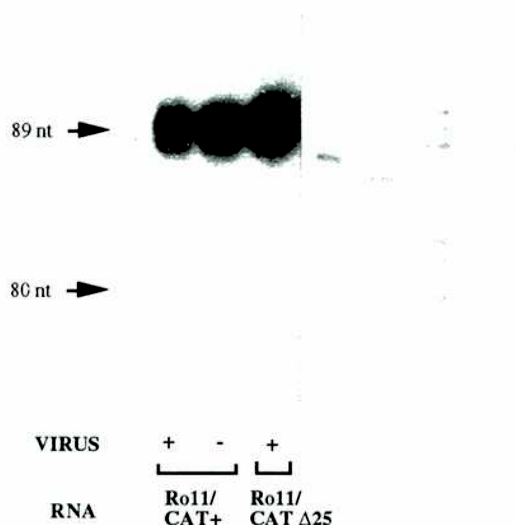
Los productos de elongación de la transcripción reversa a partir del *primer* 5'CAT fueron resueltos en gel de secuencia (6% acrilamida, 8M urea) y visualizados por autorradiografía. (Fig.21).

Como se observa en la Figura 21b en todos los casos se detecta un único producto de elongación de 89 nucleótidos que corresponde al ARN con 9 nucleótidos extra en el extremo 5'.

Este resultado podría indicar a) que el ARN no es reparado por el sistema viral, o b) que el ARN reparado represente una proporción muy pequeña del ARN transfectado.



b)



**Figura 21: Análisis del ARN Ro11/CAT+ sintetizado intracelularmente por ensayo de "primer extension".**

a) Esquema del ensayo de "primer extension". Se representa esquemáticamente el ARN cadena+ y el sitio de hibridación del oligonucleótido utilizado como iniciador. Los productos esperados de 89 nt y 80 nt corresponden respectivamente al producto de elongación del ARN Ro11/CAT+ (89) y al producto esperado de la replicación del ARN Ro11/CAT sintetizado en células transfectadas e infectadas por reparación viral.

b) Autorradiografía de los productos de elongación resueltos en gel de secuencia. El ARN fue transfectado en células infectadas (+ virus) o no (- virus). Según se indica en cada caso se transfectó ARN Ro11/CAT+ o ARN Ro11/CAT $\Delta$ 25, prácticamente no amplificado en células infectadas como control negativo.



## 5. Desarrollo del sistema de complementación: Línea celular MA104/NSP5

La obtención de un rotavirus recombinante no solo requiere la formación de una partícula infectiva que haya incorporado un segmento de ARN exógeno, sino que este virus formado sea capaz de replicarse y generar nuevas partículas virales.

Los rotavirus tienen un genoma de 11 segmentos que durante la replicación son empaquetados de modo que sea incorporada una molécula de cada segmento por partícula. La incorporación de un segmento exógeno en la partícula viral implica una de las siguientes posibilidades: a) el empaquetamiento de 12 segmentos, o b) el reemplazo de alguno de los segmentos virales por el segmento exógeno. La alternativa b) es la más probable ya que en las infecciones mixtas de rotavirus es común que se intercambien segmentos, y nunca fueron descritos virus que contengan más de 11 segmentos. Si la incorporación del ARN exógeno excluye a un segmento genómico viral, el virus recombinante resultante sería defectivo en algún gen, lo que implicaría la pérdida de una función viral. El ARN exógeno diseñado en esta tesis para ser incorporado al genoma viral es análogo al segmento 11 viral, ya que contiene las secuencias no codificantes del segmento 11 que se suponen implicadas en la replicación y en el empaquetamiento del segmento, por lo tanto es muy probable que el segmento excluido sea el mismo segmento 11. Teniendo en cuenta esta posible limitación en el rescate de un virus recombinante se desarrolló una línea celular, susceptible de ser infectada por rotavirus, que expresa constitutivamente la proteína viral no estructural NSP5 codificada por el segmento 11. La proteína viral expresada en estas células podría complementar virus defectivos en el segmento 11, permitiendo su amplificación.

### *Construcción de vectores y transfección de células MA104*

Para desarrollar la línea celular que expresa constitutivamente la proteína viral NSP5, se transfectaron células MA104, susceptibles de ser infectadas por rotavirus, con un vector de expresión eucariota que contiene la región codificante completa del gen 11 y un marcador de selección.

Los vectores de expresión eucariota utilizados fueron: **pKG4** (promotor SV40) y **pRSV/TKNeo** (promotor RSV). El vector pRSV/TKNeo fue construido a partir de los

vectores comerciales pKG4 y pRSV/CAT, reemplazándose el promotor del pKG4 (SV40) por el promotor RSV presente en el plásmido pRSV/CAT (materiales y métodos).

La región codificante del gen 11 fue obtenida por RT/PCR a partir de ARN genómico total de la cepa de rotavirus porcino C60 y fue clonada en ambos vectores de expresión inmediatamente después del promotor respectivo (SV40 y RSV) obteniéndose los plásmidos **pKG4/11** y **pRSV/TK-Neo/11** (Fig.22) (materiales y métodos). Ambos plásmidos contienen como marcador de selección el gen de resistencia a neomicina, cuya expresión confiere a las células resistencia a G418 (análogo de la neomicina).

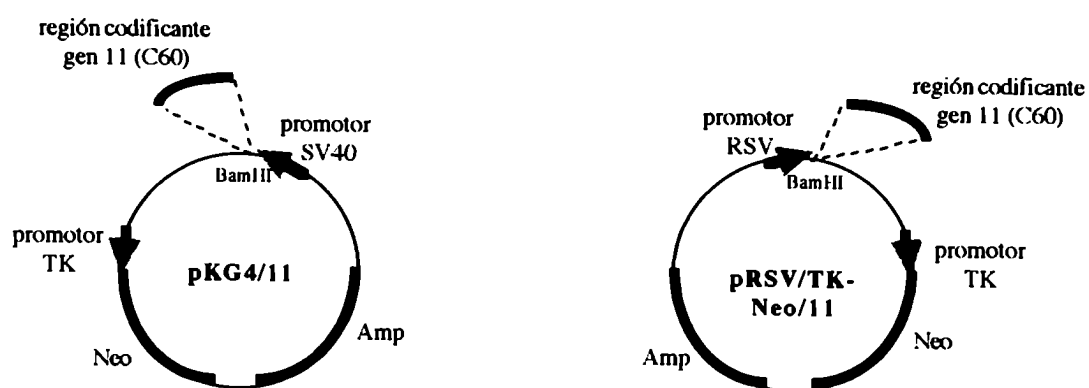
Las transfecciones fueron realizadas por el método de fosfato de calcio (materiales y métodos), utilizando alternativamente los dos plásmidos descriptos: pKG4/11 y pRSV/TK-Neo/11.

Las células transfectadas fueron seleccionadas en presencia de G418, y se aislaron clones resistentes a la droga que indica la incorporación en forma estable del plásmido en el genoma celular.

#### ***Análisis de los clones celulares***

Los distintos clones obtenidos fueron analizados para determinar la expresión del gen 11 en las células transfectadas.

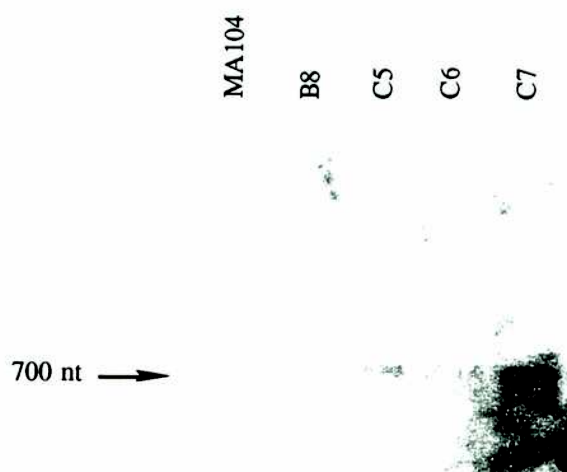
La presencia del ARNm del gen 11 viral en los distintos clones fue analizada por ensayo de *Northern-blot* (Fig.23). El ARN total obtenido de los distintos clones fue resuelto por electroforesis en gel de agarosa, transferido a una membrana de nitrocelulosa, y el ARNm viral fue identificado por hibridación con una sonda específica del segmento 11 (materiales y métodos). El resultado fue confirmado por RT/PCR: transcripción reversa del ARN total con oligo dT y amplificación posterior con oligonucleótidos específicos (no se muestra) (materiales y métodos). Los clones positivos seleccionados fueron denominados MA104/NSP5-C1, C5, C6 y C7, fueron todos provenientes de la transfección realizada con el plásmido pKG4/11.



**Figura 22: Esquema de los plásmidos pKG4/11 y pRSV/TK-Neo/11**

La región codificante del gen 11 de rotavirus cepa C60 fue clonada en el sitio BamHI de los vectores de expresión eucariota pKG4 y pRSV/TK-Neo.

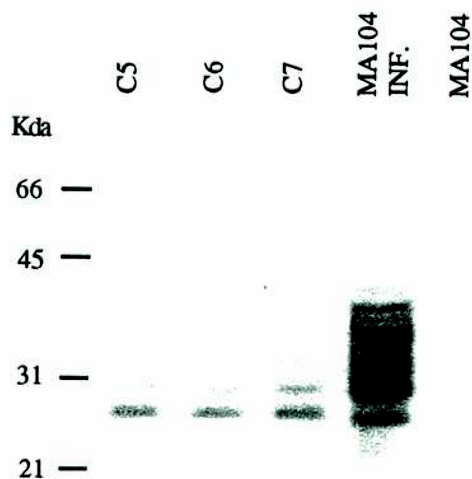
El vector pRSV/TK-Neo fue construido por unión del fragmento: ScaI-HindIII del vector pKG4 (conteniendo el promotor TK seguido del gen de resistencia a neomicina) y del fragmento ScaI-HindIII del plásmido pRSV/CAT (conteniendo el promotor RSV)



**Figura 23: Northern-Blot: clones MA104/NSP5.**

Análisis por Northern-Blot del ARN total de distintos clones estables MA104/NSP5: B8 (plásmido pRSV/TKNeo/11), C5, C6 y C7 (plásmido pKG4/11) y MA104 (células sin transfectar). El ARN total fue resuelto por electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante y transferido a una membrana de nitrocelulosa. En la figura se observa la autorradiografía de la membrana hibridizada con una sonda específica de la región codificante del gen 11 (cepa C60). A la izquierda se indica el tamaño molecular aproximado de las bandas observadas.

El nivel de expresión de la proteína viral NSP5 en los clones seleccionados fue evaluado analizando extractos citoplasmáticos de los distintos clones por *western-blot*. En el ensayo de *western-blot* los extractos citoplasmáticos fueron resueltos en gel de poliacrilamida (PAGE) 12% y transferidos a membrana de nitrocelulosa (materiales y métodos). La proteína viral fue detectada con un suero anti-NSP5, obtenido en cobayos contra la proteína de fusión  $\beta$ Gal/NSP5 (materiales y métodos), y un segundo anticuerpo anti-inmunoglobulina de cobayo conjugado con peroxidasa. Los resultados del *western-blot* (Fig.24) indican la presencia de dos polipéptidos que reaccionan específicamente con el suero anti-NSP5 (Fig.24: C5,C6,C7). Estos polipéptidos de 26 y 28 kDa son detectados normalmente en extractos citoplasmáticos de células infectadas por rotavirus (Fig.24: MA104inf.) y corresponden a formas O-glicosiladas de NSP5 (González and Burrone, 1991) (Afrikanova *et al.*, 1996). De los resultados obtenidos se deduce que la proteína NSP5, expresada constitutivamente en las células MA104/NSP5, es modificada post-traduccionalmente en forma similar que en las células infectadas. Por lo tanto, esta modificación post-traduccionale de la NSP5 no depende de la presencia de otras proteínas virales. Confirmando esta observación, la expresión del mismo gen 11 en células de insecto infectadas por el baculovirus recombinante Bacu-C60/11 desarrollado en el laboratorio (no se muestra) produce los mismos polipéptidos. Es importante remarcar que si bien ambos polipéptidos se detectan por *western-blot* en células que expresan constitutivamente NSP5 y en células infectadas por rotavirus, la proporción relativa de ambos polipéptidos es distinta. En células infectadas la relación entre ambos polipéptidos (26kDa: 28kDa) es aproximadamente de 1:1, mientras que en la línea celular MA104/NSP5 la relación es aproximadamente de 2:1. Tampoco se observan en la línea celular MA104/NSP5 las isoformas de NSP5 correspondientes a la proteína hiperfosforilada (32-34 kDa) presentes en las células MA104 infectadas con rotavirus (Afrikanova *et al.*, 1996). Se desconoce hasta el momento el significado biológico de las modificaciones de la proteína, y por lo tanto no se puede descartar que esta diferencia pueda tener consecuencias en la funcionalidad de la proteína expresada en la línea celular desarrollada.



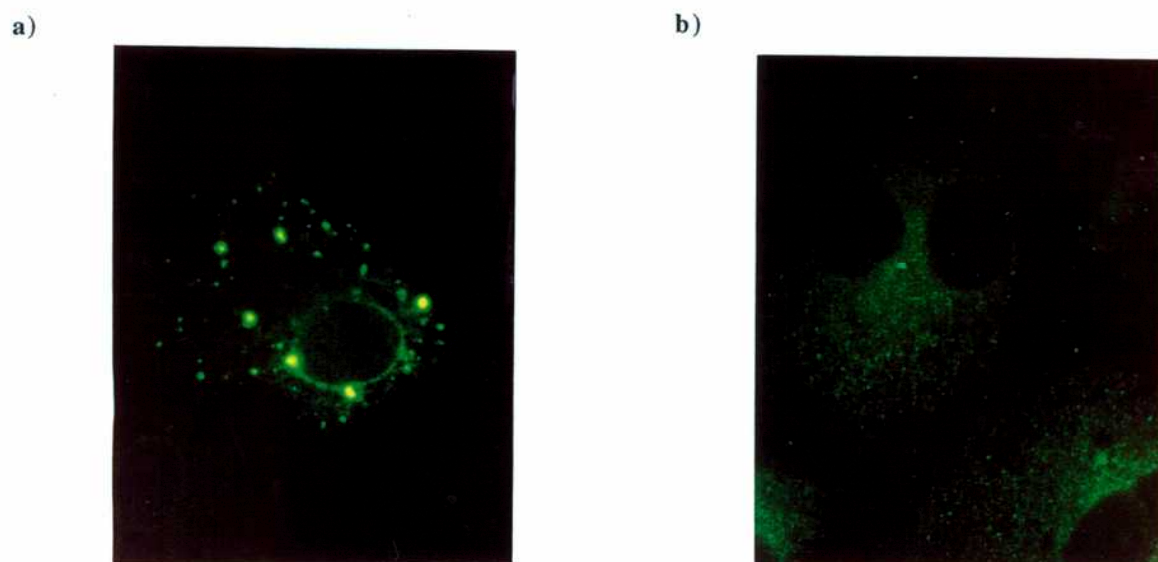
**Figura 24: Western-Blot de extractos citoplasmáticos de clones MA104/NSP5.**

Análisis por Western-Blot de extractos citoplasmáticos de células transfectadas MA104/NSP5 (C5, C6, C7), infectadas con rotavirus cepa OSU (MA104 INF.) y MA104 sin infectar (MA104), resueltos por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE 12%) y transferidos a membrana de nitrocelulosa. La proteína NSP5 fue identificada con antisuero anti-NSP5 y un segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa.

Para estudiar la localización de NSP5 en las células MA104/NSP5 se utilizaron ensayos inmunocitoquímicos. Las células MA104/NSP5 y MA104 infectadas con rotavirus fueron fijadas con metanol/acetona y permeabilizadas con Triton X100 (materiales y métodos). La proteína NSP5 fue detectada con el suero de cobayo anti-NSP5 y un segundo anticuerpo anti-inmunoglobulina de cobayo conjugado con a) isotiocianato de fluoresceína, o b) peroxidasa. Los resultados indican que la localización de la proteína NSP5 en las células MA104/NSP5 es citoplasmática, al igual que en células infectadas. Su distribución en el citoplasma es en forma reticulada y difusa, claramente diferente a la observada en las células infectadas. En células infectadas NSP5 se acumula en focos discretos que se corresponden con los denominados virosomas donde ocurre la replicación viral (Fig.25). Esta diferencia en la distribución de la proteína indica que su acumulación en focos específicos en células infectadas es consecuencia de su interacción con otras proteínas virales o con el ARN viral.

#### ***Susceptibilidad de células MA104-NSP5 a infección con rotavirus***

La replicación de rotavirus recombinantes defectivos en el gen 11 en las células MA104/NSP5 requiere que estas células sean susceptibles de ser infectadas por el virus. El grado de infectividad fue determinado por titulación de un inóculo de rotavirus, paralelamente en células MA104 y MA104/NSP5, por dilución límite (dilución máxima del inóculo con la que se obtiene efecto citopático total) y por inmunofluorescencia a las 8 horas de infección (recuentos de focos citoplasmáticos de infección). En ambos casos los resultados fueron equivalentes en los dos tipos celulares, indicando que la presencia de la proteína viral en el citoplasma de las células MA104/NSP5 previa a la infección no inhibe la penetración del virus ni su replicación.



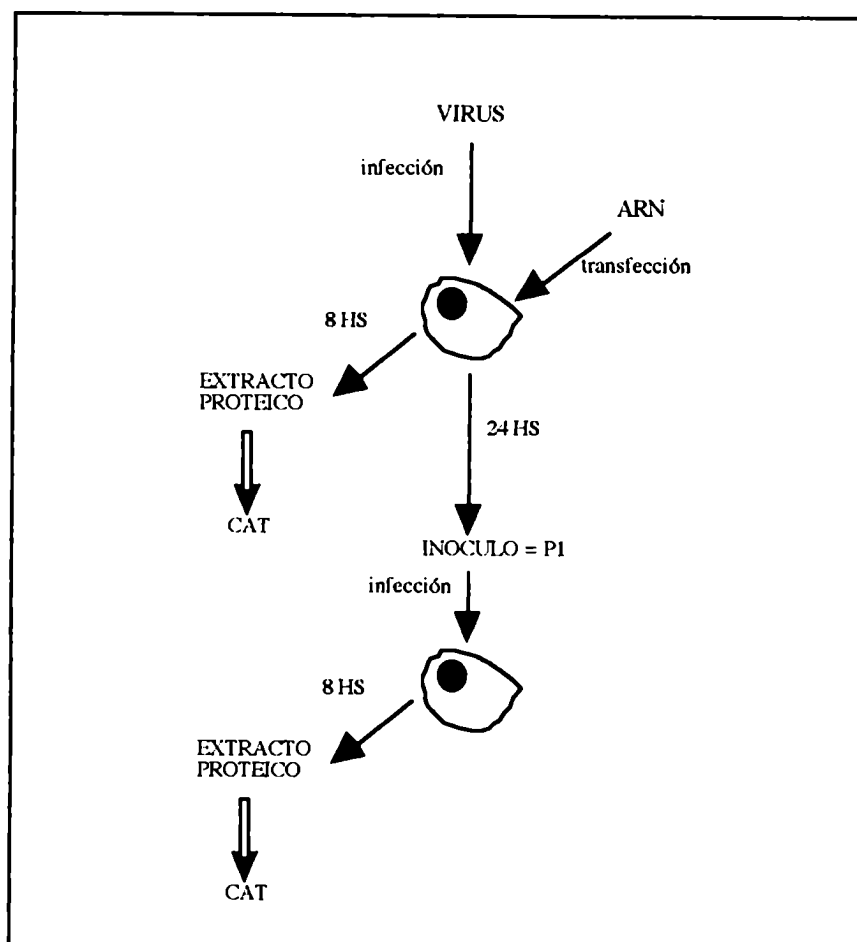
**Figura 25: Localización de la proteína NSP5 en el citoplasma de células MA104 infectadas y células MA104/NSP5**

Proteína NSP5 detectada por inmunofluorescencia indirecta en el citoplasma de: **a)** células MA104 infectadas con rotavirus porcino (cepa OSU) y **b)** células MA104/NSP5, que expresan constitutivamente la proteína NSP5. (aumento 1000x)



## **6. Empaquetamiento del segmento de ARN exógeno: Búsqueda de partículas virales recombinantes.**

Los resultados obtenidos en los ensayos descritos en las secciones 2, 3 y 4, muestran que en células infectadas un fragmento de ARN exógeno, análogo al segmento 11 cadena+, es usado como molde para la síntesis de ARN cadena - y es amplificado. Estos datos indican que el ARN exógeno es replicado y transcrito en células infectadas. Teniendo en cuenta que la replicación en rotavirus ocurre en partículas subvirales con función replicativa (intermediarios replicativos), en las cuales el ARNdc es internalizado a medida que es sintetizado, puede suponerse que el ARNdc sintetizado a partir del ARN exógeno se encuentra empaquetado en intermediarios replicativos. Los intermediarios replicativos son los precursores de las partículas de simple cubierta que pueden actuar como partículas de transcripción, sintetizando nuevo ARNm viral, o por maduración formar partículas virales completas. Por lo tanto, es probable que estas partículas replicativas, donde el segmento de ARN exógeno Ro11/CAT es replicado, puedan continuar su maduración dando lugar a la formación de partículas virales recombinantes. Con el objetivo de evaluar si, en las condiciones en que fueron realizados los ensayos descritos en las secciones precedentes, los intermediarios replicativos que contienen un segmento exógeno siguen su maduración formando virus recombinantes, las células infectadas y transfectadas fueron incubadas por períodos más largos (hasta efecto citopático total), para dar lugar a la producción de progenie viral. Los ensayos fueron realizados como se describe en el esquema de la Figura 26. Una monocapa de células MA104, infectadas con rotavirus y transfectadas 1 hora post-infección con el ARN exógeno (cadena+), fue incubada hasta efecto citopático total (de 14 a 24 horas). La presencia de virus recombinantes en el inóculo fue evaluada infectando células MA104/NSP5 a baja multiplicidad y analizando la actividad CAT de los extractos de las células cosechadas 8 horas post-infección.



**Figura 26: Esquema de los ensayos de infección-transfección para producción de virus recombinantes.**

Inóculo P1: obtenido por infección de células MA104 con rotavirus y transfección con ARN exógeno cadena+. Las células se incubaron hasta efecto citopático total (24 horas) y el inóculo se obtuvo por ciclos sucesivos de congelado y descongelado.

La presencia de virus recombinantes en el inóculo P1 fue evaluada por ensayo CAT de extractos de células infectadas con P1 y cosechadas 8 horas post-infección.

**Ensayo 1: Empaquetamiento del segmento Ro11/CAT por virus OSU**

Células MA104, infectadas con rotavirus (cepa OSU), fueron transfectadas con el ARN Ro11/CAT+ e incubadas hasta efecto citopático total. La presencia de partículas virales recombinantes, que hayan incorporado el segmento exógeno, en el inóculo proveniente de la transfección-infección, fue analizada por infección de células MA104/NSP5 y determinación de actividad CAT en los extractos citoplasmáticos obtenidos 8 horas post-infección. El ensayo se repitió numerosas veces pero en ninguno de los casos se detectó actividad CAT en las células infectadas con inóculos provenientes de células transfectadas e infectadas.

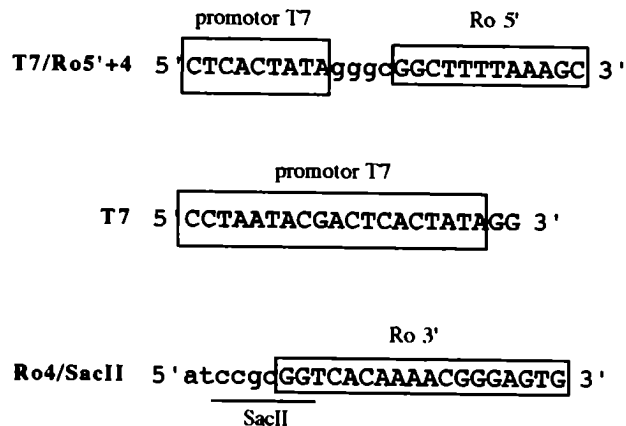
Los mismos inóculos también fueron analizados por dilución límite. Diluciones sucesivas del inóculo fueron usadas para infectar monocapas de MA104/NSP5 en policubetas de 96 pocillos, de modo de infectar cada pocillo con una única partícula viral, evitando la competencia con el virus salvaje. Los extractos provenientes fueron evaluados por técnica de ELISA para detectar la presencia de la enzima CAT (KIT-CAT). Esta metodología tampoco permitió detectar la proteína CAT en los extractos de las células infectadas.

Este resultado podría indicar que el ARN exógeno, es replicado y transcrito en las células infectadas por rotavirus en intermediarios replicativos que no maduran correctamente formando partículas virales infectivas. La falta de empaquetamiento podría deberse a que las señales de empaquetamiento estén localizadas en la región codificante del segmento 11, no presente en el ARN exógeno Ro11/CAT.

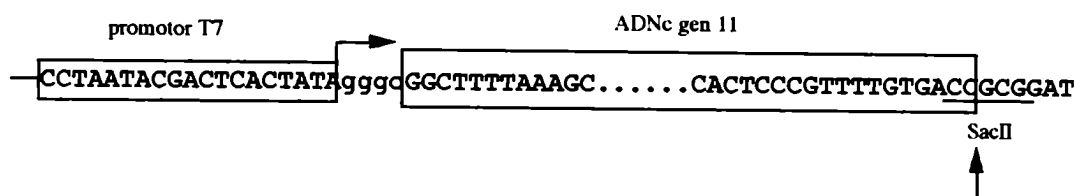
**Ensayo 2: Empaquetamiento del segmento 11 de la cepa OSU por virus C60.**

Para analizar si la falta de empaquetamiento del segmento Ro11/CAT se debe a la falta de alguna señal presente en la región codificante del segmento viral, se realizó el mismo ensayo transfectando un ARN exógeno idéntico al ARN cadena+ del segmento 11 viral. Células MA104, infectadas en este caso con la cepa de rotavirus C60, fueron transfectadas con ARN cadena + sintetizado *in vitro* correspondiente al segmento 11 completo de la cepa OSU de rotavirus: **ARN OSU11(+4)**.

## a) Oligonucleótidos



## b) pT7/OSU11 +4



## c) ARN OSU11 +4



**Figura 27: Representación esquemática del plásmido pT7/OSU11(+4). Construcción y ARN transcripto**

a) Oligonucleótidos T7/Ro5'+4, T7 y Ro4/SacII, utilizados para amplificar el fragmento T7/gen11 a partir del plásmido pOSU11 (gen 11 completo de rotavirus cepa OSU)

b) Fragmento del plásmido pT7/OSU11(+4), donde se indica el promotor T7 fusionado al extremo 5' viral. La secuencia del gen 11 completo se encuentra enmarcada. Las flechas marcan el inicio (superior) y fin (inferior) de la transcripción. Sitio SacII: sitio de restricción utilizado para la linearización del plásmido previa a la transcripción.

c) ARN OSU11+4 transcripto por la polimerasa T7 a partir del plásmido pT7/OSU11+4 linearizado por SacII. Se indican los 4 nucleótidos no virales que presenta en su extremo 5'.

El ARN OSU11(+4) fue obtenido por transcripción *in vitro* del vector **pT7OSU11(+4)** linearizado por SacII (Fig.28). El método de detección de las partículas virales recombinantes que hayan incorporado el ARN exógeno se basa en la diferencia de tamaños entre el segmento 11 de la cepa OSU (670pb), transfectado y replicado en la célula, y el segmento 11 de la cepa C60 de infección (1212pb). Se purificó ARN genómico viral del inóculo obtenido de la infección-transfección, los distintos segmentos genómicos fueron separados por electroforesis en gel de poliacrilamida (gel de Laemmli) y el perfil de migración de los distintos segmentos virales fue visualizado por tinción con plata (Materiales y métodos). El perfil del ARN genómico obtenido corresponde a la cepa C60, y no se detectó en ningún caso un segmento extra del tamaño del segmento 11 de la cepa OSU. La sensibilidad del método de detección de este ensayo es muy baja, ya que no se cuenta con un gen marcador (CAT).

De los resultados presentados se concluye que en las condiciones en que se han realizado estos ensayos no fue posible detectar virus recombinantes en la progenie obtenida a partir de células infectadas y transfectadas. Esto puede deberse a que la cantidad de virus recombinante formado se encuentre por debajo de la sensibilidad de los métodos de detección utilizados en los distintos ensayos, o a que la metodología desarrollada no permite la formación de virus recombinante. Los complejos proteicos donde ocurre la replicación y transcripción del ARN exógeno observada, podrían no continuar su maduración, para formar partículas virales completas. Por otro lado, no se puede descartar que la proteína NSP5, expresada en la línea celular MA104/NSP5, no sea capaz de complementar la deficiencia de esta proteína en los rotavirus recombinantes, o que los virus recombinantes obtenidos sean defectivos en otro segmento viral. En este caso, la pequeña proporción de virus recombinantes que podrían haberse obtenido, no podría replicarse en células MA104/NSP5 infectadas únicamente por el virus recombinante.

## *DISCUSSION*

## ***DISCUSION***

En los últimos tiempos se han desarrollado diversos sistemas que permitieron la obtención de virus recombinantes en virus con genoma a ADN circular o lineal, con genoma a ARN cadena+ y cadena- segmentado o no (ver *Introducción: Virus recombinantes*), muchos de los cuales son usados actualmente como vectores de expresión. El genoma viral es modificado *in vitro* y luego el material genético modificado se integra en el genoma viral. En los virus con genoma de ARN cadena+, el ARN genómico transfectado puede ser templado de traducción, dirigiendo la síntesis de las proteínas virales necesarias para el ciclo replicativo viral. En el caso de virus con genoma de ARN cadena- estos sistemas son más complejos debido a que el ARN cadena- no puede ser transcrito por enzimas celulares ni es templado directo de traducción. En general, es necesario reconstruir *in vitro* el complejo ribonucleoproteico (RNP) en el cual el ARN genómico se encuentra íntimamente asociado con las proteínas virales involucradas en la replicación (Luytjes *et al.*, 1989).

En los rotavirus hasta el momento no ha sido posible obtener virus recombinantes. El ARNdc genómico desnudo de los rotavirus no es infeccioso. Esto se debe a que, al igual que en los virus con genoma de ARN cadena-, las células no contienen las enzimas necesarias para la transcripción del ARNdc genómico y este ARN tampoco puede ser templado directo de traducción para dirigir la síntesis de las enzimas virales necesarias. Cuando iniciamos nuestro estudio, el único antecedente descrito en la literatura respecto a la obtención de partículas virales recombinantes en la familia Reoviridae, era el trabajo realizado por Roner y col en 1990 (Roner *et al.*, 1990), quienes señalaron la obtención de virus infeccioso por transfección del ARN de reovirus purificado (ARNdc o ARNm) junto con sus productos de traducción *in vitro*, en presencia de virus *helper*. Sin embargo, en el estudio descrito el ARN transfectado es viral, y por lo tanto no se introducen modificaciones genómicas. Además es importante remarcar que no hay trabajos posteriores que validen este sistema.

Las señales involucradas en la replicación, empaquetamiento y selección de los segmentos genómicos de los rotavirus no se conocen. En la literatura se sugiere que estas señales estarían comprendidas en las regiones 5' y 3' terminales de cada segmento. Las regiones 5' y 3' no codificantes de todos los virus de la familia Reoviridae contienen secuencias consenso terminales de 4 a 10 nt (en rotavirus 10 y 7nt en los extremos 5' y 3' respectivamente) comunes a todos los segmentos, y adyacentes a las secuencias consenso, secuencias conservadas que son segmento específicas.

En virus pertenecientes a la familia Reoviridae, se han analizado mutantes defectivos obtenidos por pasaje a alta multiplicidad. En reovirus el mínimo fragmento de delección que mantiene las señales esenciales para replicación y empaquetamiento, descrito para el segmento M1, tiene 344nt y conserva 132 nt del extremo 5' y 185 nt del extremo 3' del segmento viral, siendo las regiones 5' y 3' no codificantes de 13nt y 80nt respectivamente (Zou and Brown, 1992). En CPV, un reovirus que infecta insectos, también ha sido descrito que el menor fragmento de ARNdc empaquetado y replicado en mutantes defectivos naturales, tiene un tamaño de 315nt, conteniendo 121nt del extremo 5' y 191nt del extremo 3' (Nuss, 1988), y en fitoreovirus (WTV) el menor fragmento conserva 319 nt y 205 nt de los extremos 5' y 3' respectivamente (Anzola *et al.*, 1987). La conservación en todos los casos analizados de las regiones 5' y 3' no codificantes apoya la hipótesis de que estas secuencias contienen las señales involucradas en el reconocimiento y replicación de los segmentos virales en la familia reoviridae. El tamaño mínimo de 300nt en los segmentos de ARNdc descritos también puede indicar un requerimiento de una longitud mínima para que el segmento sea empaquetado y replicado.

Todos los mutantes de delección de virus con genoma lineal que han sido caracterizados conservan al menos uno de los extremos del virus original, y en el caso de virus con genoma segmentado podría ser una característica general la conservación de las secuencias 5' y 3'. En influenza A, la conservación de 22nt del extremo 5' y 26nt del extremo 3' en el segmento 8 viral son suficientes para permitir su replicación, empaquetamiento y transcripción (Luytjes *et al.*, 1989), y el menor mutante de delección descrito contiene 83-84nt del extremo 5' y 95-96nt del extremo 3' del segmento 8 (Jennings *et al.*, 1983).



En rotavirus no han sido descritos mutantes de delección, sin embargo, los rotavirus con rearrreglos genómicos, que presentan segmentos genómicos modificados por la inserción de secuencias, mantienen en todos los casos inalteradas las regiones 5' y 3' no codificantes.

El objetivo del trabajo presentado en este capítulo fue desarrollar un sistema para introducir en el genoma de rotavirus ARNs sintetizados *in vitro*, que permita la manipulación genética de los rotavirus. La posibilidad de modificar el genoma de estos virus es importante para el estudio de funciones virales, en el desarrollo de vacunas y en su potencial uso como vector de expresión. Por otra parte, el mismo sistema puede ser aplicable para estudiar la replicación y el empaquetamiento de los distintos segmentos virales, identificando las secuencias y/o estructuras en el ARN requeridas. Teniendo en cuenta que las regiones 5' y 3' no codificantes de los segmentos genómicos de los rotavirus podrían estar involucradas en la replicación, transcripción y empaquetamiento y que el genoma segmentado de los rotavirus posibilita el intercambio de segmentos en infecciones mixtas, hemos diseñado un metodología para incorporar al ciclo replicativo viral ARNs sintetizados *in vitro*. Estos ARNs, análogos del segmento 11 de los rotavirus tipo A, contienen las secuencias de las regiones 5' y 3' no codificantes del segmento genómico 11 de la cepa OSU, y la región codificante del gen CAT (Cloranfenicol Acetil Transferasa) incluida como gen marcador (*reporter*) en reemplazo de la región codificante del segmento viral. Los ARNs mantienen aproximadamente la dimensión del segmento viral. De todas formas, dados los antecedentes de reordenamientos del segmento 11 descritos en el capítulo I, la introducción de secuencias exógenas que incrementen el tamaño de este segmento no debería afectar su reconocimiento por el sistema de replicación viral.

### ***Reconocimiento y amplificación de un ARN exógeno por el sistema replicativo viral***

De acuerdo a los resultados obtenidos, la infección previa con rotavirus de células transfectadas con ARN Ro11/CAT cadena+ induce una amplificación significativa de la actividad CAT respecto a la actividad basal observada en células transfectadas con el

mismo ARN sin infectar. Esta amplificación de actividad CAT es específica para el ARN Ro11/CAT cadena+ ya que no se detectó actividad CAT en los extractos de células infectadas y transfectadas con ARN Ro11/CATdc o cadena-.

La amplificación de la actividad CAT en células infectadas podría producirse por a) un incremento de la cantidad de ARN Ro11/CAT+, que indicaría que el ARN transfectado es replicado y transcrito por la maquinaria viral, o b) que este ARN con extremos 5' y 3' virales sea traducido más eficientemente en células infectadas por rotavirus.

Con el objetivo de mapear las secuencias involucradas en la amplificación de CAT en células infectadas, se analizaron con la misma metodología distintas variantes del ARNs Ro11/CAT cadena+, con deleciones o mutaciones del extremo 5' y 3'. De acuerdo a los resultados obtenidos, todas las modificaciones de las secuencias de las regiones 5' y 3' no codificantes analizadas disminuyen o eliminan la actividad CAT respecto a la observada en células infectadas y transfectadas con el ARN Ro11/CAT+.

La deleción del extremo 5' viral (ARN Ro11/CAT $\Delta$ 5') disminuye la actividad CAT en células infectadas-transfectadas. Esta disminución de la actividad CAT podría deberse a una menor eficiencia de traducción de este ARN en las células infectadas o a la falta de señales requeridas para la transcripción viral del ARNdc.

Las distintas mutaciones del extremo 3' analizadas muestran claramente que esta secuencia contiene elementos o señales indispensables para la amplificación de CAT. La deleción de toda la secuencia de la región 3' viral (46nt) (ARN Ro11/CAT $\Delta$ 46), o de los últimos 25 nucleótidos (ARN Ro11/CAT $\Delta$ 25) elimina completamente la actividad CAT en células infectadas. Por lo tanto, la presencia del extremo 3' completo es indispensable para observar actividad CAT. El agregado de 9 bases extras al final de la secuencia 3' (ARN Ro11/CAT(+9)), disminuye notablemente la actividad CAT en células infectadas, mostrando que no sólo es importante la secuencia 3' viral sino también su localización en el extremo 3' terminal del ARN.

En los rotavirus, la región 3' no codificante de todos los segmentos virales presenta una secuencia consenso que involucra los últimos 7 nucleótidos. Debido a la alta conservación de esta secuencia en todos los segmentos virales se ha sugerido que esta secuencia

comprende alguna señal de reconocimiento, y se ha propuesto que podría estar relacionada con el reconocimiento del ARNm viral por la polimerasa viral en su actividad de replicasa (secuencia promotora de la replicación). La mutación de los últimos 7 nucleótidos por una secuencia completamente diferente a la secuencia consenso viral (ARN Ro11/CAT3'M) disminuye la actividad CAT observada en células infectadas pero no la elimina. Esto indicaría que probablemente esta secuencia consenso participa en la amplificación de CAT en células infectadas pero no es la única señal involucrada. Probablemente exista más de una señal en la región 3' no codificante, que en el caso de los ARNs  $\Delta 25$  o  $\Delta 46$  son eliminadas.

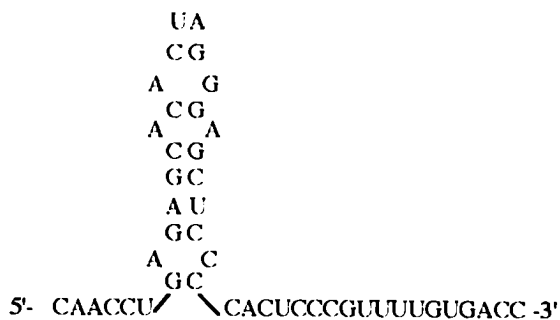
La estrecha relación entre la presencia del extremo 3' y la amplificación de CAT apoyaría la hipótesis de que la amplificación es producto de un incremento del ARNm y no de una mayor eficiencia en la traducción de mensajeros con características virales en células infectadas, ya que esta región 3' es la que se supone involucrada en la replicación. La ARN polimerasa con función de replicasa debe reconocer el extremo 3' del ARNm viral para iniciar la síntesis de la cadena-. Por lo tanto, la secuencia promotora de la replicasa viral debería estar localizada en esta región. Esta misma región 3' podría también contener alguna señal necesaria para el empaquetamiento. La amplificación del ARN exógeno dentro de la célula es únicamente posible a través de su replicación, generando ARNdc que actúe como templado para la transcripción de nuevas moléculas de ARN/CAT cadena+. La replicación del ARN Ro11/CAT+ en células infectadas fue confirmada por RT/PCR de ARN total purificado de células infectadas y transfectadas, identificando la presencia de la cadena complementaria del ARN transfectado. Si bien el ARN Ro11/CAT cadena- fue detectado por RT/PCR, no fue detectado por *northern-blot*, lo cual indica que la cantidad de ARN replicado en las condiciones de los ensayos realizados fue muy baja.

El incremento de ARN Ro11/CAT+ no pudo ser confirmado en forma directa debido a que el ARN sintetizado en células infectadas a partir del templado exógeno es indistinguible del ARN transfectado. El ensayo de extensión de *primer* realizado indicó que el ARN Ro11/CAT+ transfectado, que contienen 9 nucleótidos extra en el extremo 5', no es reparado en las células infectadas.

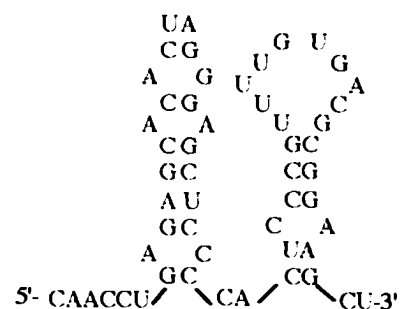
El análisis de la estructura secundaria del extremo 3' de las distintas variantes de ARN Ro11/CAT, realizado con el programa GCG, indicó la posible formación de estructuras de tipo horquilla (*stem-loop*) (Figura 28). En el caso del ARN Ro11/CAT+, la horquilla formada involucra 21 nucleótidos dejando libres los últimos 18 nucleótidos que contienen la secuencia consenso. En el ARN Ro11/CAT3'M, con los últimos 7 nucleótidos mutados, la estructura de horquilla y 18 nucleótidos libres se mantiene, aunque no presenta la secuencia consenso. El ARN Ro11/CAT(+9), que contiene 9 nucleótidos extra en el extremo 3', da lugar a la formación, inmediatamente después de la primer horquilla, de una segunda horquilla que involucra todo el extremo 3', dejando libres solo los últimos 2 nucleótidos. En este caso, la secuencia consenso se encuentra formando parte de la segunda horquilla, y podría resultar menos accesible. En el ARN Ro11/CAT $\Delta$ 25, los 21 nucleótidos remanentes de la secuencia viral, dan lugar también a la formación de una estructura de horquilla, que en este caso no deja ningún nucleótido libre en el extremo 3'.

De acuerdo a estas observaciones, podría postularse que tanto la estructura de horquilla como la existencia de un extremo 3' libre con la secuencia consenso, a partir del cual la replicasa inicie la síntesis de la cadena-, son señales involucradas en el reconocimiento y replicación del segmento 11 por la ARN polimerasa viral. En el caso de la mutación de la secuencia 3'consenso, la existencia de la estructura de horquilla y del extremo 3' libre podría permitir un cierto nivel de amplificación (replicación). La presencia de 9 bases extras en el extremo 3' disminuye aún más la actividad CAT, ya que probablemente la formación de la segunda horquilla hace que la secuencia consenso no sea accesible y que la ARN polimerasa no disponga de un extremo 3' simple cadena para iniciar la síntesis de la cadena-. En el ARN  $\Delta$ 25, la horquilla formada es distinta a la que se forma en los casos anteriores y además no deja ningún nucleótido libre. La eliminación total de amplificación en este caso podría resultar, de la falta de un extremo 3' libre simple cadena que permita el inicio de síntesis de la cadena-.

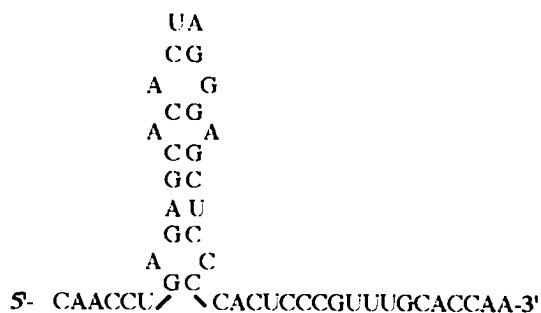
## a) ARN Ro11/CAT+



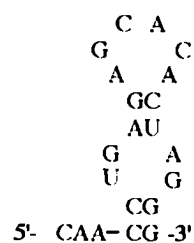
## c) ARN Ro11/CAT (+9)



## b) ARN Ro11/CAT 3'M



## d) ARN Ro11/CAT Δ25



**Fig 28: Esquema de la estructura secundaria (stem-loop) del extremo 3' no codificante del ARN cadena + viral y de los ARNs+ análogos del segmento 11**

a) ARN Ro11/CAT: 46 nucleótidos idénticos a la región 3' no codificante del ARNm del gen 11 viral.

b) ARN Ro11/CAT 3'M: 46 nucleótidos de los cuales 35 son idénticos a la región 3' no codificante del ARNm del gen 11 viral y los últimos 7 nucleótidos están mutados.

c) ARN Ro11/CAT (+9): 46 nucleótidos idénticos a la región 3' no codificante del ARNm del gen 11 viral más 9 nucleótidos extra

d) ARNRo11/CAT Δ25: delección de los 25 nucleótidos terminales de la región 3' no codificante del ARNm del gen 11 viral

Estructura secundaria (stem-loop) más probable de acuerdo al programa GCG.

En el virus L-A de *S.cerevisiae* y en el virus M1, satélite del L-A, ambos virus con genoma de ARNdc, las señales requeridas por la ARNpolimerasa para la síntesis de la cadena incluyen también un extremo 3' terminal simple cadena y una estructura de horquilla (*stem-loop*) adyacente (Esteban *et al.*, 1989) (Wickner, 1993).

El trabajo de Gorziglia y col (Gorziglia and Collins, 1992), publicado durante el transcurso de nuestros estudios del extremo 3' del segmento 11, coincide con los resultados obtenidos por nosotros. En este trabajo, usando una estrategia similar, se describe la amplificación y expresión intracelular, en células infectadas, de un ARN/CAT análogo al gen 9 de rotavirus. De acuerdo al mapeo de señales en cis necesarias para la replicación realizado en este trabajo, los autores concluyen que la secuencia consenso terminal de 7 nucleótidos es imprescindible, ya que el ARN que presenta la delección de los últimos 7 nucleótidos no produce amplificación de actividad CAT. Nuestros resultados indican que la secuencia consenso no es el único determinante, ya que su mutación no elimina totalmente la amplificación de CAT. El agregado de bases extra en el extremo 3' del ARN/CAT análogo al segmento 9, también reduce el nivel de expresión de CAT, indicando que la localización de las señales son también importantes para este segmento viral.

En los últimos años se han publicado una serie de trabajos relacionados con el estudio de las señales requeridas para la replicación de los segmentos genómicos de los rotavirus. Estos trabajos muestran los resultados obtenidos en un sistema de replicación *in vitro*, que consiste en partículas subvirales, denominadas por los autores "open cores", purificadas a partir de células infectadas por rotavirus, y que permiten la replicación de ARNs sintetizados exógenamente (Chen *et al.*, 1994). El análisis de las secuencias involucradas en la replicación de los rotavirus *in vitro* utilizando este sistema de "open cores" coinciden también con nuestros resultados. Delecciones internas del segmento genómico 9 no alteran su replicación, pero la delección de los últimos 26 nucleótidos la eliminan completamente (Chen *et al.*, 1994). El mapeo de las señales necesarias para la replicación *in vitro* del gen 8 (Patton *et al.*, 1996) y del gen 9 (Wentz *et al.*, 1996) de rotavirus A en este sistema de

"open cores" identificaron a los últimos 7 nucleótidos del extremo 3' del ARNm como la mínima señal en cis requerida para su replicación.

El extremo 3' del ARNm de los rotavirus no sólo es esencial para su eficiente replicación sino también está relacionado con su traducción. La proteína viral no estructural NSP3 interacciona con el extremo 3' de los ARNm virales, siendo la mínima señal requerida para su reconocimiento los 4 nucleótidos terminales (Poncet *et al.*, 1994). Además de unirse específicamente al extremo 3' de los ARNm virales, la proteína NSP3 interactúa con el factor de transcripción eIF4GI, desplazando a la proteína celular PABP, y probablemente está relacionada con la traducción eficiente de los ARNm virales y con la inhibición de la traducción de ARNm celulares (*shut-off*) observada en células infectadas con rotavirus (Piron *et al.*, 1998) (Vende *et al.*, 2000). No se puede descartar que el efecto de amplificación de la señal CAT observado en los estudios realizados en esta tesis pueda estar también relacionado con una mayor eficiencia de traducción en células infectadas del ARN/CAT+ que presenta un extremo 3' viral .

### **Empaquetamiento y formación de partículas virales infectivas.**

De acuerdo a los resultados obtenidos en los ensayos realizados para identificar virus recombinantes en la progenie viral de células infectadas-transfectadas con ARN Ro11/CAT+, podría concluirse que el ARN exógeno Ro11/CAT+ no es incorporado en partículas virales infectivas. No se detectó actividad CAT en los extractos de células MA104/NSP5 infectadas con los inóculos proveniente de células infectadas-transfectadas.

Una causa posible es que no haya empaquetamiento del ARN exógeno por la falta de alguna señal en cis, interna al gen 11, no presente en el ARN Ro11/CAT. En el virus L-A de *Saccharomyces cerevisiae*, virus con genoma de ARNdc (un segmento), y en el virus M1 satélite del virus L-A, la señal de empaquetamiento, responsable de la unión del ARN viral a las partículas replicativas, se encuentra localizada dentro de la región codificante, a 400 nt del extremo 3', y comprende una secuencia de 44nt (L-A) y 40nt (M1) que forma una estructura de horquilla (*stem-loop*) (Fujimura *et al.*, 1990). En el bacteriófago  $\phi 6$ , con genoma segmentado de ARNdc (3 segmentos), las secuencias de empaquetamiento,

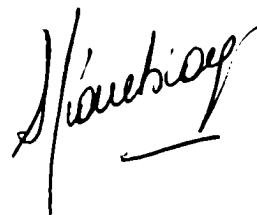
particulares para cada segmento genómico, se localizan en las regiones 5' no codificantes de cada segmento viral y comprenden regiones de 300, 250 y 205nt (Gottlieb *et al.*, 1994). Los ensayos de infección-transfección realizados con el ARN del segmento 11 completo de la cepa OSU sintetizado *in vitro* tampoco fueron efectivos en la obtención de virus recombinantes. En estos ensayos la sensibilidad del método de detección es muy baja, ya que consiste en detectar los virus recombinantes por tinción con plata del ARN genómico extraído del inóculo obtenido de la infección-transfección. Sería interesante construir un ARN que contenga un gen *reporter*, como el gen CAT, además de la secuencia completa del gen 11, que permita analizar más sensiblemente la presencia o no de virus recombinantes. Un segmento genómico con estas características tendría aproximadamente el doble de tamaño del gen 11 original (1300nt), pero teniendo en cuenta que el gen 11 rearreglado de la cepa C60 tiene una dimensión de 1212nt, es previsible que su tamaño no sea un impedimento para su empaquetamiento.

Queda por lo tanto todavía abierto el desarrollo de un sistema adecuado para introducir mutaciones o expresar genes exógenos en rotavirus, y el estudio y mapeo de las secuencias involucradas en el preciso y selectivo empaquetamiento de los distintos segmentos virales.



## CONCLUSIONES

- El ARN Ro11/CAT cadena+, análogo al ARNm del segmento 11 de los rotavirus tipo A (cepa OSU), puede ser incorporado al ciclo replicativo viral cuando es transfectado en células previamente infectadas por rotavirus. Los ARNs Ro11/CAT cadena- y de transfectados en condiciones similares no son sustrato de la maquinaria viral.
- Las señales involucradas en el reconocimiento del ARNm del segmento 11 por la ARN polimerasa viral están localizadas en la región 3' no codificante. La polimerasa viral requiere para iniciar la síntesis de la cadena-: la secuencia consenso, común a todos los segmentos virales, un extremo 3' simple cadena libre y la formación de una estructura de horquilla (*stem loop*) que deje libre los últimos 18 nucleótidos donde está comprendida la secuencia consenso.
- Las secuencias de empaquetamiento aparentemente no estarían localizadas en las regiones 5' y 3' no codificantes, ya que no se detectaron en los ensayos realizados virus recombinantes en los que se haya empaquetado el segmento de ARN exógeno.



# **MATERIALES Y METODOS**

## 1. Virus y células

Los rotavirus humanos, v47, v51, v61, v115, v158, v252 y v183, cedidos por el Hospital de Niños de Buenos Aires Ricardo Gutierrez, fueron aislados de materia fecal de niños con gastroenteritis aguda.

Las cepas de rotavirus usadas en los distintos ensayos fueron: cepas porcinas OSU y C60 y cepa de simio SA11. La cepa C60 proviene de un aislamiento natural obtenido en un criadero de cerdos de la provincia de Buenos Aires, adaptado a cultivo y clonado por dilución límite ( ).

Los virus fueron propagados en células de riñón de embrión de mono (MA104) en presencia de tripsina. Las células se crecieron en medio MEM Dulbecco, suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2mM glutamina y gentamicina (50µg/ml). Las infecciones fueron realizadas a baja multiplicidad (0.1 PFU) para la preparación de inóculos de las distintas cepas de virus usadas, o a la multiplicidad indicada los distintos ensayos. El inóculo de virus fue activado inmediatamente antes de la infección por incubación con tripsina (10µg/ml) 30 minutos a 37°C. Luego de una hora de adsorción del virus a 37°C, las células son mantenidas en MEM Dulbecco sin suero, en presencia de tripsina (2µg/ml), hasta efecto citopático total (100% de infección). Los inóculos son preparados a partir de células infectadas por congelamiento y descongelamiento para lisar las células y liberar el virus intracelular, y clarificados por centrifugación a 1000g durante 10 minutos.

## 2. Extracción de ARNdc genómico viral

La extracción de ARNdc genómico a partir de muestras de materia fecal se realizó según la metodología descrita por Gómez y col (Gómez *et al.*, 1986). Las suspensiones de materia fecal al 10% en PBS, fueron llevadas a una concentración final de 0.5M de CILi, 1% SDS, 10mM EDTA, y extraídas con un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (50:49:1), incubando 10 minutos con agitación a 56°C. El ARN presente en la fase acuosa fue precipitado por adición de 2.5 volúmenes de etanol.

El ARNdc del genoma viral de virus replicados en cultivo se purificó de inóculos por dos extracciones con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (50:49:1), y precipitación con 2.5 volúmenes de etanol.

## 3. Análisis del perfil electroforético del ARNdc genómico.

El ARNdc purificado de las distintas cepas de rotavirus fue analizado por electroforesis en gel de acrilamida (gel de Laemmli 10%) y visualizado por tinción con plata.

Tinción con plata: El gel fue fijado en 10 % etanol/ 0,5 % de ácido acético durante 30 minutos. Se incubó con una solución de nitrato de plata 0,011 M durante 30 minutos y fue revelado con la solución reveladora (7,5 gs de hidróxido de sodio y 1,9 ml. de formaldehído (40%) en 250 ml. de agua destilada). Para frenar la reacción, se lava el gel con una solución de ácido acético al 5 % en agua destilada.

## 4. Clonado y secuencia del gen 11 a partir de ARNdc viral.

El ADNc del segmento 11 fue sintetizado por transcripción reversa a partir de ARNdc genómico total. El ARNdc viral (5µg) fue desnaturalizado por calentamiento a 90°C durante 2 minutos e incubado durante 1 hora a 37°C con transcriptasa reversa (MMLV-RT, Stratagene) y los oligonucleótidos específicos (Ro B o Ro C). La reacción se llevó a cabo en buffer de transcriptasa reversa 1x (50mM Tris-HCl (pH 8.3), 75mM KCl, 3mM ClMg<sub>2</sub>, 10mM DTT), 500µM de cada uno de los dideoxinucleótidos trifosfato (dNTP), 300ng de *primer* específico y 20 unidades de transcriptasa reversa (MMLV-RT, Stratagene) en presencia de inhibidor de ribonucleasas (RNAsin), en un volumen de reacción de 20µl.

El ADNc fue amplificado por PCR usando *primers* específicos (RoA+RoB, RoC+RoE, RoC+RoB). La reacción de amplificación fue realizada en un volumen de 50µl conteniendo: 250µM de cada dNTP, 300ng de cada *primer*, y 1.25 unidades de Taq polimerasa (Boehringer) en 1x buffer comercial de amplificación. Se realizaron 30 ciclos de amplificación en las siguientes condiciones: 1 minuto de denaturación a 93°C, 1 minuto de annealing a 54°C y 1.30 minutos de elongación a 72°C, finalizados los 30 ciclos se

incubó 7 minutos a 72°C para la elongación de todas las cadenas iniciadas. Los productos de amplificación (ADNdc) fueron purificados por elución de gel de agarosa.

Los fragmentos purificados fueron fosforilados por T4 polinucleótido kinasa en presencia de 1mM ATP y clonados en el sitio SmaI del vector pUC18.

Los clones obtenidos fueron secuenciados por el método de secuenciación basado en la terminación base específica de reacciones de elongación de un oligonucleótido por la polimerasa T7 (modificación de la técnica de Sanger y col, 1977) (Pharmacia, T7 Sequencing Kit) La reacción de secuencia se realizó sobre ADN plasmídico doble cadena desnaturalizado por NaOH, a partir de los *primers* universal y reverso complementarios al plásmido pUC18 a ambos lados del sitio de clonado, o un *primer* interno, complementario a la secuencia del gen 11, en presencia de [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]dATP.

***Secuencias de los oligonucleótidos utilizados en la amplificación y secuencia del segmento 11:***

**RoA:** 5'GATATTGGACCATCTGA3' (nt 196 a 212, complementario a la cadena- del segmento 11)

**RoE:** 5'TCAGATGGTCCAATATC3' (complementario al *primer* A);

**RoB:** 5'GGTCACAAAACGGGAGTG3' (últimos 18 nt del extremo 3', complementario a la cadena+)

**RoC:** 5'GGCTTTTAAAGCGCTACAGTGATG3' (primeros 24 nt del extremo 5', complementario a la cadena-).

**RoD:** 5'GATGCTACAGTGGACTCTTC3' (corresponde a una región interna presente en todos los segmentos 11 rearrreglados de los distintos aislamientos (nt 376 al 395))

**5. Construcción de vectores de Transcripción para la síntesis de ARNs análogos del segmento 11**

Como base de todas las construcciones se sintetizó un fragmento de ADN de 94 pb que contiene las secuencias 5' y 3' no codificantes del segmento 11 de rotavirus (21 y 46 nucleótidos respectivamente) separadas por un sitio de restricción BamHI. Este fragmento fue obtenido por el apareamiento y posterior elongación de dos oligonucleótidos parcialmente complementarios, **Ro1** y **Ro2**, de secuencia **Ro1:** 5'TCAGATCTGGCTTTTAAAGCGCTACAGTGGATCCAACCTGAGAGCACA CTA3' y **Ro2:** 5'ATGAAGCTTCCGCGGTACAAAACGGGAGTGGGG AGCTCCCTAGTGTGCTCT3', que contienen las secuencias de los extremos virales no codificantes del segmento 11 5' (en negritas) y 3' (en negritas y subrayado) (ver Figura 1 a del capítulo II). Cantidades equimoleculares de los oligonucleótidos Ro1 y Ro2 fueron desnaturalizadas a 85°C por 5 minutos, dejando luego llegar a temperatura ambiente lentamente para permitir el apareamiento, y los extremos fueron completados por elongación con fragmento Klenow en presencia de dNTP. En el diseño de los oligonucleótidos se incluyeron los sitios de restricción BglII(extremo 5') y HindIII (extremo 3') para su posterior clonado en el vector de expresión; y el sitio SacII para la transcripción *in vitro*. El fragmento Ro11 fue clonado en el plásmido comercial pUC18 (sitio SmaI) y secuenciado (**pUC-Ro11**). extraído por digestión del vector por BglII-HindIII y subclonado en el vector de expresión pT3/SP6 digerido por BglII-HindIII, bajo el control del promotor de la ARN polimerasa T3 (vector **pT3Ro11**).

Para obtener el vector **pT3Ro11/CAT** la región codificante del gen CAT fue clonada en el sitio BamHI del plásmido pT3Ro11. La región codificante del gen CAT fue amplificada por PCR a partir del plásmido pRSV/CAT usando los oligonucleótidos **CT1** 5'CGGGATCCATGGAGAAAAAATC3' y **CT2** 5'ACGGATCCATTACG CCCC3', las secuencias complementarias al gen CAT se muestran en negritas y subrayados los sitios de restricción BamHI utilizados para el subclonado del fragmento. El fragmento fue clonado y secuenciado en pUC18, extraído del pUC18 por digestión con BamHI y subclonado en el sitio BamHI del plásmido pT3Ro11 obteniéndose el plásmido pT3Ro11/CAT.

La construcción del vector de transcripción que codifica para el ARN Ro11/CAT cadena-se realizó a partir del plásmido pT3Ro11/CAT. El fragmento del plásmido pT3Ro11/CAT

que contiene el gen CAT flanqueado por los extremos 5' y 3' virales (fragmento Ro5'-CAT-Ro3') fue amplificado con los oligonucleótidos **5'/SacII** de secuencia 5'TACCGCGGCTTTTAAAGCGCTACAG3' y **3'/SP6** de secuencia 5'ATTTTAGGTGACACTATAGGTCACAAAAC3' donde se muestran en negritas las secuencias correspondientes al gen 11 de rotavirus y subrayado la secuencia del promotor de transcripción de la ARN polimerasa SP6. El fragmento amplificado fue clonado en pUC18 y secuenciado: **pSP6Ro11/CAT**. El vector pSP6Ro11/CAT contiene la secuencia complementaria del fragmento Ro5'-CAT-Ro3' bajo el control del promotor de la ARN polimerasa SP6 (ver Fig 2, capítulo 2).

El fragmento de ADN **T3Ro11/CATΔ46**, a partir del cual se sintetizó el ARN Ro11/CATΔ46 (deleción del extremo 3' viral), se obtuvo por amplificación (PCR) del vector pT3Ro11/CAT con los oligonucleótidos: **94up** (5'CCGAGCGCAGCGAGT CAGTGA3'), complementario al vector pT3Ro11/CAT 94nt upstream del promotor T3, y el oligonucleótido **CT2** (5'ACGGATCCATTACGCC3'), complementario al extremo 3' del gen CAT.

El vector de transcripción **pT3Ro11/CATΔ5'** se construyó a partir del plásmido pT3Ro11/CAT. El plásmido pT3Ro11/CAT fue digerido por las enzimas de restricción BglII y BamHI, que eliminan el extremo 5' no codificante viral (Ro5') y el gen CAT, y el gen CAT fue reclonado en el sitio BglII.

El fragmento de ADN **T3Ro11/CAT3'm** se obtuvo por amplificación del vector pT3Ro11/CAT con los oligonucleótidos **94up** y **3'm** (5'TTGGTGCAAACGGGAGT GGG3'), complementario al extremo 3' viral pero contiene mutaciones en los últimos 7 nucleótidos.

Para construir el vector de transcripción **pT7/OSU11+4**, que codifica para el ARN del segmento 11 completo de la cepa OSU, un fragmento obtenido por PCR y que comprende la secuencia del ADNc completa del segmento 11 de la cepa OSU y el promotor T7, fue clonada en el plásmido pUC18. El fragmento fue amplificado a partir del plásmido **pOSU/11** (ADNc del gen 11 de la cepa OSU clonado en el sitio SmaI del pUC18) por 2 amplificaciones consecutivas. En la primera amplificación se usó un oligonucleótido complementario al extremo 5' del segmento 11, que incluyen parte de la secuencia del promotor de la ARN polimerasa T7 y 4 nucleótidos extra entre la secuencia del promotor y el inicio del gen 11 (**T7/Ro5/+4**: 5'**CTCACTATAGGGC GGCTTTTAAAGC3'**, donde se muestra en negrita la secuencia del extremo 5' viral, y subrayada la secuencia del promotor T7), y un oligonucleótido complementario al extremo 3' **Ro4/SacII** (5'ATCCGCGGTCACAAAACGGGAGTG3'), que incluye el sitio SacII. La segunda amplificación se realizó con el oligonucleótido **T7** (5'CCTAATACGACTCACTATAGG3') que contiene el resto de la secuencia promotora y el oligonucleótido **Ro4/SacII**. El fragmento amplificado fue purificado y clonado en el vector pUC18 (sitio SmaI) (ver Fig. 20, capítulo II).

## 6. Transcripción *in vitro*

Los distintos vectores de transcripción fueron linearizados por las enzimas de restricción indicadas en cada caso. Los vectores linearizados, fueron incubados al menos por 2 horas con Proteinasa K, y luego purificados por extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y precipitación con etanol, previo a la transcripción. El ADN fue resuspendido en H<sub>2</sub>O a una concentración final de 1μg/μl, para ser usado directamente en la síntesis de los ARN transcritos. Los fragmentos de ADN amplificados por PCR fueron purificados por una columna de Sephacryl comercial (Spun Column, Pharmacia), seguido por digestión por Proteinasa K, extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y precipitación por etanol, previo a la transcripción.

La transcripción se llevó a cabo en las siguientes condiciones: a) polimerasas T7 o T3: según indicaciones del Kit de transcripción de Stratagene, 1μg de ADN fue transcrito en un volumen de reacción de 25μl, en 1x buffer de transcripción (40mM Tris-HCl pH8, 8mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM espermidina, 50mM NaCl), 400μM de cada ribonucleótido trifosfato (rNTP), 30mM DTT, 1 unidad de inhibidor de ribonucleasas (RNase-Block, Stratagene) y 10 unidades de polimerasa T7 o T3, incubando 1 hora a 37°C. b) ARN polimerasa SP6, según la metodología descrita por Krieg y Melton (Methods in Enzymology), 1μg d

ADN fue transcrito en 25µl de reacción conteniendo 1x buffer de transcripción (40mM Tris-HCl pH7.5, 6mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM espermidina, 10mM DTT, 100µg/ml de albumina de suero bovino (BSA)), 500µM de cada rNTP, 1 unidad de RNase-Block y 10 unidades de polimerasa SP6 (Boehringer), incubando 1 hora a 40°C.

La transcripción de los ARNs correspondientes a la cadena+ viral se realizó en presencia del análogo de cap (7mG(5') ppp(5')G, Biolabs) en una concentración de 400µM, de modo de obtener transcritos con una estructura m<sup>7</sup>G cap en el extremo 5'.

Segun lo indicado en cada ensayo, el ARN transcripto fue usado directamente después de la transcripción o previamente tratado con DNasa para eliminar el templado de ADN. La mezcla de reacción de la transcripción fue incubada 15 minutos a 37°C con 10 unidades de DNasa, seguido por extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y precipitación con etanol.

La cantidad de ARN transcripto fue determinada en espectrofotómetro (absorbancia a 260), o por tinción con bromuro de etidio en gel de agarosa.

**Ro11/CAT+:** El ARN Ro11/CAT+ se sintetizó por transcripción *in vitro* del plásmido pT3Ro11/CAT linearizado por SacII.

**Ro11/CAT-:** El ARN Ro11/CAT- se sintetizó por transcripción *in vitro* del plásmido pSP6Ro11/CAT linearizado por SacII.

**Ro11/CATΔ46:** El ARN Ro11/CATΔ46 se sintetizó por transcripción *in vitro* del fragmento T3Ro11/CAT.

**Ro11/CATΔ25:** El ARN Ro11/CATΔ25 se sintetizó por transcripción *in vitro* del vector pT3Ro11/CAT linearizado por SacI.

**Ro11/CAT+9:** El ARN Ro11/CAT+9 se sintetizó por transcripción *in vitro* del vector pT3Ro11/CAT linearizado por HindIII, que deja 9 bases extra en el extremo 3'.

**Ro11/CAT 3'm:** El ARN Ro11/CAT 3'm se sintetizó por transcripción *in vitro* del fragmento de ADN T3Ro11/CAT3'm.

**Ro11/CATΔ5':** El ARN Ro11/CATΔ5' se sintetizó por transcripción *in vitro* del vector pT3Ro11/CATΔ5'.

## 7. Transfección de ARN viral transcripto *in vitro* e infección de células.

La introducción del ARN transcripto *in vitro* en células MA104 fue realizada por el sistema de transfección mediado por liposomas (Lipofectin Reagent, GIBCO BRL).

Las células (MA104 o las indicadas en cada caso) fueron crecidas a confluencia en placas de cultivo de tejido de 35mm de diámetro (aproximadamente 3 x 10<sup>5</sup> células), y transfectadas con un complejo de ARN-liposomas. Los ARNs sintetizados *in vitro* (0.5-1µg de ARN en 20µl de H<sub>2</sub>O) fueron incubados con 13µg de Lipofectina (20µl de dilución 2:1 del reactivo comercial, BRL) durante 15 minutos a temperatura ambiente, para permitir la formación de los complejos ARN-liposomas. La mezcla de reacción fue llevada a 1.5ml con medio MEM Dulbecco sin suero y agregada a la monocapa de células, previamente lavadas con PBS para eliminar el suero del medio de cultivo con que fueron crecidas las células. Luego de 4 horas de incubación la lipofectina fue removida y se agregaron 3ml de medio fresco sin suero, continuando la incubación por el período de tiempo indicado en cada caso.

En los ensayos de transfección de ARN en células infectadas para: producción de inóculo y purificación de ARN total (*northern-blot*, geles de acrilamida, PCR y *primer extension*), las transfecciones fueron realizadas en placas de 60mm de diámetro, incrementando las cantidades de ARN y lipofectina en relación a la cantidad de células transfectadas.

## 8. Ensayo de actividad CAT.

Las células transfectadas con ARN análogos del segmento 11 (Ro11/CAT) de rotavirus o infectadas con los inóculos provenientes de los ensayos de infección-transfección, fueron lavadas con PBS a las 8 horas (o al tiempo indicado en cada caso) de transfección o infección, y usadas directamente en la preparación de extracto celular, o congeladas a -70°C hasta el momento de preparación del extracto. Para la preparación de los extractos para el ensayo CAT, las células se resuspenden en 200µl de Tris-HCl 0.25M (pH 7.5) y son lisadas por 3 ciclos consecutivos de congelamiento-descongelamiento

(nitrógeno líquido, 37°C). El lisado celular se centrifuga a 10000 g durante 10 minutos, y el sobrenadante se incuba durante 10 minutos a 65°C para inactivar las deacetilasas endógenas del extracto.

Los ensayos de actividad CAT fueron realizados según metodología descrita en Maniatis. Usualmente se usaron 80 µl del sobrenadante del extracto celular, que corresponden a 25 µg de proteínas, en una reacción que contiene 10 µl de <sup>14</sup>C-cloranfenicol (25 µCi/ml), 15 µl de 5 mM acetil coenzima A y 55 µl de 0.25 M Tris-HCl (pH 7.5), incubada durante 2 horas a 37°C. Los productos de acetilación del <sup>14</sup>C-cloranfenicol fueron resueltos por cromatografía en placa delgada de sílica gel, que permite separar las formas mono- y diacetiladas del cloranfenicol del compuesto no modificado, y visualizados por autorradiografía.

Para cuantificar la actividad de CAT, los sectores radiactivos de la placa, visualizados por autorradiografía, fueron cortados y la radiactividad fue medida en contador de centelleo líquido.

### 9. Traducción *in vitro*.

La traducción *in vitro* de los ARN cadena+ usados en los ensayos de infección-transfección, se llevó a cabo en un sistema de lisado de reticulocitos de conejo (Translation Kit, Reticulocyte, Type I, Boehringer), según las instrucciones provistas por el fabricante. El ARN transcripto *in vitro* (aproximadamente 1 µl de la mezcla de reacción que corresponde a 0.5 µg de ARN) fue incubado con el lisado de reticulocitos en un volumen de reacción de 25 µl, en presencia de 2 µl <sup>35</sup>S-metionina (1000 Ci/mmol, 5 mCi/500 µl), durante 60 minutos a 30°C. Los productos de reacción (5 µl) fueron hervidos en buffer muestra analizados en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y visualizados por autorradiografía.

### 10. Extracción de ARN total de células infectadas y transfectadas.

Monocapas de células MA104, infectadas y transfectadas fueron lavadas con PBS 8 horas post-transfección y fueron lisadas en 4 M isotiocianato de guanidinio. Para la extracción de ARN se utilizó una modificación del método de Chirgwin y col (Chirgwin *et al.*, 1979). El lisado celular fue extraído con fenol ácido/cloroformo de modo que el ARN quede en la fase acuosa, y luego el ARN fue precipitado con isopropanol (Sambrook *et al.*, 1989).

### 11. Transcripción reversa del ARN cadena- y Amplificación por PCR

El ARN total fue extraído de células transfectadas e infectadas, 8 horas post-transfección, fue utilizado para la síntesis de ADNc a partir de un oligonucleótido específico del ARN Ro11/CAT cadena-. Los oligonucleótidos utilizados fueron diseñados con una secuencia específica complementaria al gen CAT (cadena-): Ad/CT1 5'**GACTCGAGTCGACATCGGATCCATGGAGAAAAAATC3'** o complementaria al extremo 3' de la cadena- del segmento 11 viral Ad/Ro6 5'**GACCTCGAGTCGACATCGGGCTTTTAAAGCGCTACAGT3'** Ambos oligonucleótidos contienen en el extremo 5' una secuencia no complementaria al ARN que denominamos secuencia adaptadora (indicada en negrita y subrayada). El ARN total fue incubado durante 1 hora a 37°C con transcriptasa reversa (MMLV-RT, Stratagene) en una mezcla de reacción (20 µl) que contiene buffer de transcriptasa reversa 1x (50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM ClMg<sub>2</sub>, 10 mM DTT), 500 µM de cada uno de los dideoxidonucleótidos trifosfato (dNTP), 150 ng de *primer* específico y 20 unidades de transcriptasa reversa (MMLV-RT, Stratagene) en presencia de inhibidor de ribonucleasas (RNasa Block, Stratagene).

El ADNc sintetizado a partir de los distintos oligonucleótidos fue amplificado por PCR usando los pares de oligonucleótidos: Ad+CT2 y Ad+Ro4, el oligonucleótido Ad de secuencia: 5'**GACTCGAGTCGACATCG3'** corresponde a la secuencia indicada en negrita en los oligonucleótidos Ad/CT1 y Ad/Ro6. Los oligonucleótidos CT2: 5'ACGGATCCATTACGCCCC3' y Ro4: 5'GGTCACAAAACGGGAGTGG3' corresponden a secuencias del extremo 3' del gen CAT y del segmento 11 de rotavirus respectivamente. Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo en una mezcla de reacción

de 50  $\mu$ l, a partir de 5  $\mu$ l de la mezcla de transcripción reversa, purificada por columna para remover los oligonucleótidos usados en la transcripción reversa (MicroSpin Columns, Pharmacia), 300 ng de cada oligonucleótido, 250  $\mu$ M dNTP, 2mM MgCl<sub>2</sub>, y 1.25 unidades de ADN polimerasa (AmpliTaq, Perkin Elmer Cetus) en el buffer de reacción suplementado con la enzima. Se realizaron 30 ciclos de amplificación mediante el siguiente esquema: 1 minuto 94°C, 1 minuto a 54°C y 1.30 minuto a 72°C. Los productos amplificados fueron analizados en gel de agarosa 1.6 %, en buffer TBE, y visualizados por tinción con bromuro de etidio.

### 11. Estudio del extremo 5' del ARN sintetizado intracelularmente por extensión de un oligonucleótido (*Primer extension*)

Los estudios del extremo 5' del ARN análogo al segmento 11, transfectado y sintetizado intracelularmente, se realizaron por elongación del *primer* 5'CAT de secuencia: 5'ACGATGCCATTGGGATATATC3', complementario al extremo 5' del gen CAT (nucleótidos 34-45, del fragmento del gen CAT usado en la construcción de los ADNc), por transcripción reversa del templado de ARN total de células.

El ARN total de células infectadas-transfectadas o solo transfectadas, fue extraído 8 horas post-transfección, según fue descrito previamente. El ARN purificado (1/10 del ARN total purificado a partir de  $5 \times 10^5$  células) y 2 pmoles del *primer* específico, marcado en el extremo 5' con [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP ( $1 \times 10^6$  cpm/pmoles), fueron desnaturalizados por calentamiento por 2 minutos a 90°C. La reacción de elongación fue realizada en 1x buffer de transcriptasa reversa con una concentración final de 500  $\mu$ M de cada dNTP y 20 unidades de transcriptasa reversa, por incubación a 42°C durante 1 hora. Alternativamente, el annealing del ARN-oligonucleótido se realizó según la metodología descrita en Maniatis y col, por incubación del ARN y el oligonucleótido en buffer de hibridación, durante 10 minutos a 85°C y luego annealing a 42°C por 12 horas.

Los productos de transcripción reversa fueron precipitados con etanol, resuspendidos en buffer de siembra con formamida, y resueltos por electroforesis en gel 6% poliacrilamida-7M urea, usando como marcador de peso molecular una secuencia de ADN.

### 12. Marcación de ARN viral en células infectadas y transfectadas

Se infectaron células  $5 \times 10^5$  MA104 con rotavirus, a una multiplicidad de infección de 5-10. Luego de 1 hora de adsorción, el inóculo fue removido y las células fueron lavadas con buffer salino (ClNa 0.9%). Las células fueron incubadas en medio MEM sin fosfatos, con 5  $\mu$ g/ml de actinomicina D, la mezcla de transfección (ARN+lipopectina, preincubada 15 minutos a temperatura ambiente), y 200  $\mu$ Ci/ml de <sup>32</sup>Pi. 4-5 horas post-transfección se prepararon partículas subvirales a partir de las células infectadas o no infectadas. Las partículas subvirales fueron tratadas con nucleasa micrococcal (10  $\mu$ g/ml en presencia de 1mM Cl<sub>2</sub>Ca) durante 20 minutos a 30 °C, para degradar el ARN no protegido. El ARNdc fue purificado de las partículas por extracción con fenol:cloroformo y precipitación con etanol, resuelto en gel de poliacrilamida 10% (gel de Laemmli), y visualizado por autorradiografía.

### 13. Vectores de Expresión eucariota: línea celular MA104/NSP5

El ADNc de la región codificante del gen I1 (cepa C60), fue amplificado con los oligonucleótidos Ros1 y Ros 2, de secuencia Ros1: 5'CTGGATCCTTACAAA TCTTC3' (nucleótidos 604-615 del gen I1, subrayado), y Ros2: 5'ACGGAT CCGTGATGTCTC3' (nucleótidos 19-28 del gen I1). Cada oligonucleótido incluye un sitio BamHI para el clonado del fragmento amplificado en los vectores de expresión. El fragmento Ros1-Ros2 fue clonado en pUC18, secuenciado y subclonado en los vectores de expresión: pKG4, bajo el control del promotor SV40 (pKG4/11), y en el vector pRSV/TKNeo, bajo el control del promotor RSV (pRSV/TK-Neo/11) (ver Fig. 1b, capítulo II). Ambos vectores incluyen el gen de  $\beta$ -lactamasa (resistencia a ampicilina), para selección y replicación del plásmido en bacterias, y el gen de resistencia a la neomicina para selección en células eucariotas. El vector pRSV/TKNeo se obtuvo a partir de los plásmidos pKG4 y pRSVCAT, por ligado del fragmento ScaI-HindIII del pKG4, que incluye la secuencia de



poliadenilación, y el gen de resistencia a neomicina bajo el control del promotor TK del vector pKG4, y del fragmento ScaI-HindIII del pRSVCAT, que incluye el promotor RSV. El ligado de ambos fragmentos reconstituye el gen de resistencia a ampicilina, permitiendo la selección del vector recombinante.

Los plásmidos fueron amplificados en *E. coli* (DH5- $\alpha$ ), y el ADN fue purificado por gradiente de CICs. Previa a la transfección el ADN fue linearizado por digestión con la enzima de restricción ScaI.

#### 14. Transfección de células MA104.

Células MA104 ( $1.5 \times 10^5$  células, placa 60mm de diámetro) fueron transfectadas por el método de fosfato de calcio (Sambrook *et al.*, 1989) con los distintos vectores de expresión (pKG4/11 y pRSV/TK-Neo/11). 10 $\mu$ g de ADN plasmídico purificado y linearizado fue diluido en una solución 0.25M Cl<sub>2</sub>Ca y agregado gota a gota a una solución 50mM Hepes [pH7.1], 280mM NaCl, 1.5mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, produciéndose la coprecipitación del ADN y fosfato de Ca. La mezcla de transfección fue incubada 30 minutos a temperatura ambiente y agregada sobre la monocapa de células, a las que previamente (4 horas antes) se ha cambiado el medio. La selección fue aplicada 24 horas post-transfección, agregando medio fresco (MEM Dulbecco+10% suero) con 500 $\mu$ g/ml de G418 (Geneticin, GIBCO). Los focos de células transformadas fueron levantados 4 semanas post-transfección, y amplificados en presencia de antibiótico.

#### 15. Análisis de los clones de células MA104/NSP5 por Northern-blot y PCR

El ARN de células fue purificado de acuerdo al protocolo descrito en Currents Protocols in Molecular Biology.

Una monocapa de células, crecidas a confluencia ( $5 \times 10^6$  células), fue lisada en 500 $\mu$ l de solución denaturante (4M tiocianato de guanidina, 25mM citrato de sodio [pH 7], 0.1M  $\beta$ -mercaptoetanol, 0.5% N-lauroylsarcosina [Sarkosyl]). Se agregó secuencialmente al lisado, 50 $\mu$ l de 2M acetato de sodio [pH 4], 500 $\mu$ l de fenol ácido (saturado con agua) y 100 $\mu$ l de cloroformo:alcohol isoamílico (49:1), se incubó 15 minutos en hielo, y se centrifugó 20 minutos a 4°C.

El ARN fue resuspendido en H<sub>2</sub>O/ 0.5% SDS y precipitado con 3M acetato de sodio, para eliminar contaminación con ADN genómico.

**Northern-blot:** El ARN purificado fue resuelto en gel de agarosa con formaldehído (Sambrook *et al.*, 1989) y transferido a una membrana de nitrocelulosa. El ARNm del gen 11 fue detectado en los filtros por hibridación con una sonda específica marcada radiactivamente, y visualizado por autorradiografía.

**PCR:** El ADNc fue sintetizado a partir de 5 $\mu$ g de ARN total usando oligo dT como *primer*. El ADNc fue amplificado usando los *primer* RoA (nt 196 a 212 respecto a la secuencia del gen 11 de OSU strain) y *primer* RosI complementario a los últimos 20 nt antes de codón de stop.

#### 16. Western-blot

Se prepararon extractos de proteínas de los distintos clones de células MA104/NSP5 por lisis de monocapas de células ( $5 \times 10^6$  células) en buffer TNN (100mM Tris-HCl [pH 8], 250mM NaCl, 0.5% NP-40, 1mM PMSF) o en buffer TNT (10mM Tris-HCl [pH 7.5], 350mM NaCl, 0.5% Triton X-100). Las células fueron resuspendidas en buffer de lisis (a una concentración de  $1-2 \times 10^7$  células/ml), incubadas 10 minutos en hielo y centrifugadas a 10 000g a 4°C por 10 minutos, para remover los núcleos y restos celulares.

Los extractos así preparados fueron llevados a 1x buffer Laemmli y resueltos en geles reductores de 12% poliacrilamida, 0.1% SDS. Las proteínas se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa en buffer de transferencia (25mM Tris, 192mM glicina, 0.1% SDS, 20% metanol), durante 2 horas a 200mA o 12 horas a 50mA. Las membranas se bloquearon con 5% leche descremada en TBS, mínimo 1 hora a temperatura ambiente. Luego se incubaron 1 hora con el antisuero anti-NSP5 (dilución 1:250 en TBS/ 5% leche) a temperatura ambiente, seguido de incubación de 1 hora con un suero anti-

Inmunoglobulina de cobayo conjugado con peroxidasa (dilución 1:1000 en TBS/ 5% leche). La proteína fue visualizada por revelado de la membrana con un sustrato cromogénico: DAB(diaminobenzidina)/níquel en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### **17. Inmunocitoquímica**

Las células fueron crecidas en cubreobjetos, fijadas y permeabilizadas por incubación 10 minutos con metanol frío (-20°C), 5 minutos con acetona fría (-20°C) y 15 minutos con PBS/0.3% Triton X-100. Se bloqueó 30 minutos con 1% BSA en PBS y suero de conejo (dilución 1:150). Luego se incubó 1 hora a temperatura ambiente con el antisero de cobayo anti-NSP5 (dilución 1:150 en PBS/BSA), seguido por 1 hora con suero de conejo anti-inmunoglobulina de cobayo conjugado con isotiocianato de fluoresceína o conjugado con peroxidasa (dilución 1:150 en PBS/BSA 1%). Después de la incubación con cada anticuerpo, las células fijadas se lavaron con PBS/BSA 1%. Las células tratadas con anticuerpo conjugado con fluoresceína se visualizaron directamente en microscopio de epifluorescencia Zeiss. Las células tratadas con el segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa fueron visualizadas por reacción con el sustrato cromogénico (DAB/níquel).

### **18. Expresión de βgal/NSP5 en E.coli y producción de antisuero anti-NSP5.**

El vector de expresión pUR288/11 (González and Burrone, 1991) contiene la región codificante del gen 11 de la cepa OSU clonada en fase a continuación del gen lacZ, bajo el control del promotor lac inducible. La proteína de fusión βGal/NSP5 fue expresada por inducción con IPTG de un cultivo de bacterias E.coli previamente transformadas con el plásmido recombinante.

La proteína βGal/NSP5 fue purificada por electroelución a partir de geles de poliacrilamida y fue utilizada como antígeno en la inmunización de cobayos para obtener anticuerpos específicos contra la proteína viral NSP5.

Los sueros obtenidos fueron titulados por ensayo de ELISA. Se usó como captura un lisado de células infectadas con rotavirus (6 horas de infección) en buffer de lisis con detergente no iónico, diluido a una concentración de proteínas de 1μg/ml. El suero fue positivo para el ensayo de ELISA hasta una dilución de 1:1600.

- Afrikanova, I., Fabbretti, E., Miozzo, M.C. and Burrone, O.R. (1998) Rotavirus NSP5 phosphorylation is up-regulated by interaction with NSP2. *J.Gen.Virol.*, **79**, 2679-2686.
- Afrikanova, I., Miozzo, M.C., Giambiagi, S. and Burrone, O. (1996) Phosphorylation generates different forms of rotavirus NSP5. *J.Gen.Virol.*, **77**, 2059-2065.
- Albert, M.J. and Bishop, R.F. (1984) Cultivation of human rotaviruses in cell culture. *J.Med.Virol.*, **13**, 377-383.
- Albert, M.J., Unicomb, L.E. and Bishop, R.F. (1987) Cultivation and characterisation of human rotavirus with "super short" RNA patterns. *J.Clin.Microbiol.*, **25**, 183-185.
- Allen, A.M. and Desselberger, U. (1985) Reassortment of human rotaviruses carrying rearranged genomes with bovine rotavirus. *J.Gen.Virol.*, **66**, 2703-2714.
- Andrew, M.E., Boyle, D.B., Coupar, B.E.H., Reddy, D., Bellamy, A.R. and Both, G.W. (1992) Vaccinia-rotavirus VP7 recombinants protect mice against rotavirus-induced diarrhoea. *Vaccine*, **10**, 189-191.
- Andrew, M.E., Boyle, D.B., Whitfeld, P.L., Lockett, L.J., Anthony, I.D., Bellamy, A.R. and Both, G.W. (1990) The immunogenicity of Vp7, a rotavirus antigen resident in the endoplasmic reticulum, is enhanced by cell surface expression. *J.Virol.*, **64**, 4776-4783.
- Anzola, J.V., Zhengkai, X., Asamizu, T. and Nuss, D.L. (1987) Segment-specific inverted repeats found adjacent to conserved terminal sequences in wound tumor virus genome and defective interfering RNAs. *Proc.Natl.Acad.Sci.*, **84**, 8301-8305.
- Arias, C., Romero, P., Alvarez, V. and López, S. (1996) Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity. *J.Virol.*, **70**.
- Au, K.S., Chan, W.K., Burns, J.W. and Estes, M.K. (1989) Receptor activity of rotavirus nonstructural glycoprotein NS28. *J.Virol.*, **63**, 4553-4562.
- Au, K.S., Mattion, N.M. and Estes, M.K. (1993) A subviral particle binding domain on the rotavirus nonstructural glycoprotein-NS28. *Virology*., **194**, 665-673.
- Baas, D.M., Mackow, E.R. and Greenberg, H.B. (1991) Identification and partial characterization of a rhesus rotavirus binding glycoprotein on murine enterocytes. *Virology*, **183**, 602-610.
- Ball, J., Tian, P., Zeng, C., Morris, A. and Estes, M. (1996) Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. *Science*, **272**, 101-107.
- Ballard, A., McCrae, M.A. and Desselberger, U. (1992) Nucleotide sequences of normal and rearranged RNA segments 10 of human rotavirus. *J.Gen.Virol.*, **73**, 633-638.
- Bellinzoni, R.C., Mattion, N.M., Burrone, O., González, S., La Torre, J. and Scodeller, E.A. (1987) Isolation of group A swine rotavirus displaying atypical electropherotypes. *J.Clin.Microbiol.*, **25**, 952-954.
- Berkner, K. (1988) Development of Adenovirus Vectors for the Expression of Heterologous Genes. *Biotechniques*, **6**, 616-629.
- Berkner, K.L., Schaffhausen, B.S., Roberts, T.M. and Sharp, P.A. (1987) Abundant expression of polyomavirus middle T antigen and dihydrofolate reductase in an adenovirus recombinant. *J.Virol.*, **61**, 1213-1220.
- Besselaar, T.G., Rosenblatt, A. and Kidd, A.H. (1986) Atypical rotaviruses from South African neonates. *Arch.Virol.*, **87**, 327-330.
- Bishop, R.F. (1993) Development of candidate rotavirus vaccines. *Vaccine*, **11**, 247-254.
- Bishop, R.F., Davidson, G.P., Holmes, I.M. and Ruck, B.J. (1973) Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with viral gastroenteritis. *Lancet*, **2**, 1281-1283.

- Blackhall, J., Fuentes, A., Hansen, K. and Magnusson, G. (1997) Serine protein kinase activity associated with rotavirus phosphoprotein NSP5. *J.Virol.*, **71**, 138-144.
- Blackhall, J., Fuentes, A. and Magnusson, G. (1996) Genetic stability of a porcine rotavirus RNA segment during repeated plaque isolation. *Virology*, **225**.
- Blackhall, J., Munoz, M., Fuentes, A. and Magnusson, G. (1998) Analysis of rotavirus nonstructural protein NSP5 phosphorylation. .
- Both, G.W., Lockett, L.J., Janardhana, V., Edwards, S.J., Bellamy, A.R., Graham, F.L., Prevec, L. and Andrew, M.E. (1993) Protective immunity to rotavirus-induced diarrhoea is possibly transferred to newborn mice from naive dams vaccinated with a single dose of a recombinant adenovirus expressing rotavirus VP7SC. *Virology*, **193**, 940-950.
- Boyle, J.F. and Holmes, K.V. (1986) RNA-binding proteins of bovine rotavirus. *J.Virol.*, **58**, 561-568.
- Bridger, J. (1987) Novel rotavirus in animal and man. *Ciba Found Symp.*, **128**, 5-23.
- Bridger, J.C., Pedley, S. and McCrae, M.A. (1986) Group C rotaviruses in humans. *J.Clin.Microbiol.*, **23**, 760-763.
- Brottier, P., Nandi, P., Bremont, M. and Cohen, J. (1992) Bovine rotavirus segment-5 protein expressed in the baculovirus system interacts with zinc and RNA. *J.Gen.Virol.*, **73**, 1931-1938.
- Browne, E., Bellamy, A. and Taylor, J. (2000) Membrane-destabilizing activity of rotavirus NSP4 is mediated by a membrane-proximal amphipatic domain. *J.Gen.Virol.*, **81**, 1955-1959.
- Bujarski, J.J. and Kaesberg, P. (1986) Genetic recombination between RNA components of a multipartite plant virus. *Nature*, **321**, 528-531.
- Burke, K.L., Dunn, G., Ferguson, M., Minor, P.D. and Almond, J.W. (1988) Antigen Chimaeras of poliovirus as potential new vaccines. *Nature*, **332**, 81-82.
- Chan, W., Penaranda, M., Crawford, S. and Estes, M. (1986) Two glycoproteins are produced from the rotavirus neutralization gene. *Virology*, **151**, 243-252.
- Chen, D., Gombold, J.L. and Ramig, R.F. (1990) Intracellular RNA synthesis directed by temperature sensitive mutants of simian rotavirus SA11. *Virology*, **178**, 143-151.
- Chen, D., Luongo, C., Nibert, M. and Patton, J. (1999) Rotavirus open cores catalyze 5'-capping and methylation of exogenous RNA: evidence that VP3 is a methyltransferase. *Virology*, **265**, 120-130.
- Chen, D., Zeng, C.Q.Y., Wentz, M.J., Gorziglia, M., Estes, M.K. and Ramig, R.F. (1994) Template-dependent, in vitro replication of rotavirus RNA. *J.Virol.*, **68**, 7030-7039.
- Chirgwin, J., Przybyla, A., McDonald, R. and Rutter, W. (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*, **18**, 5294.
- Ciarlet, M. and Estes, M. (1999) Human and most animal rotavirus strains do not require the presence of sialic acid on the cell surface for efficient infectivity. *J.Gen.Virol.*, **80**, 943-948.
- Clapp, L.L. and Patton, J.T. (1991) Rotavirus morphogenesis: domains in the major inner capsid protein essential for binding to single-shell particles and for trimerization. *Virology*, **180**, 697-708.
- Cohen, J., Laporte, A., Charpilienne, A. and Scherrer, R. (1979) Activation of rotavirus RNA polymerase by calcium chelation. *Arch.Virol.*, **60**, 177-186.
- Collins, P., Mink, M. and Stec, D. (1991) Rescue of synthetic analogs of respiratory syncytial virus genomic RNA and effect of truncations and mutations on the expression of a foreign reporter gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **88**, 9663-9667.

- Conner, M.E., Matson, D.O. and Estes, M.K. (1994) Rotavirus vaccines and vaccination potential. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.*, **185**, 285-337.
- Conzelmann, K.K. and Schnell, M. (1994) Rescue of Synthetic Genomic RNA Analogs of Rabies Virus by Plasmid-Encoded Proteins. *J.Virol.*, **68**, 713-719.
- Coulson, B.S. and Masendycz, P. (1990) Measurement of rotavirus neutralizing coproantibody in children by fluorescent focus reduction assay. *J.Clin.Microbiol.*, **28**, 1652-1654.
- Crompton, J., Toogood, C.I.A., Wallis, N. and Hay, R.T. (1994) Expression of a foreign epitope on the surface of the adenovirus hexon. *J.Gen.Virol.*, **75**, 133-139.
- Dedieu, J.F., Ronco, J., van der Werf, S., Hogle, J.M., Henin, Y. and Girard, M. (1992) Poliovirus Chimeras Expressing Sequences from the Principal Neutralization Domain of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J.Virol.*, **66**, 3161-3167.
- Denisova, E., Dowling, R., LaMonica, R., Shaw, S., Scarlata, F., Ruggeri, F. and Malckow, E. (1999) Rotavirus capsid protein VP5\* permeabilizes membranes. *J.Virol.*, **73**, 3147-3153.
- Desselberger, U. and McCrae, M. (1994) The rotavirus genome. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.*, **185**, 31-66.
- Domingo, E., Díez, J., Martínez, M., Hernández, J., Holguín, A., Borrego, B. and Mateu, M. (1993) New observations on antigenic diversification of RNA viruses. Antigenic variation is not dependent on immune selection. *J.Gen.Virol.*, **74**, 2039-2045.
- Dong, Y., Zeng, C., Ball, J., Estes, M. and Morris, A. (1997) The rotavirus enterotoxin NSP4 mobilizes intracellular calcium in human intestinal cells by stimulating phospholipase C-mediated inositol 1,4,5-triphosphate production. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **94**, 3960-3965.
- Dowling, W., Denisova, E., LaMonica, R. and Mackow, E. (2000) Selective membrane permeabilization by the rotavirus VP5\* protein is abrogated by mutations in an internal hydrophobic domain. *J.Virol.*, **74**, 6368-6376.
- Dyall-Smith, M.L., Ladzins, I., Tregear, G.W. and Holmes, I.H. (1986) Location of the major antigenic sites involved in rotavirus serotype-specific neutralization. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **83**, 3465-3468.
- Eaton, B.T. and Gould, A.R. (1987) Isolation and characterisation of orbivirus genotypic variants. *Virus Res.*, **6**, 363-382.
- Eckert, K.A. and Kunkel, T.A. (1990) High fidelity DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Nucleic Acids Research.*, **18**, 3739-3744.
- EGGEN, R., Verver, J., Wellink, J., De Jong, A., Goldbach, R. and van Kammen, A. (1989) Improvements of the infectivity of in vitro transcripts from cloned Cowpea Mosaic Virus cDNA: impact of terminal nucleotide sequences. *Virology*, **173**, 447-455.
- Eglitis, M.A. and French Anderson, W. (1988) Retroviral vectors for introduction of genes in mammalian cells. *Biotechniques*, **6**, 608-614.
- Espejo, R., López, S. and Arias, C. (1981) Structural polypeptides of simian rotavirus SA-11 and the effect of trypsin. *J.Virol.*, **37**, 156-160.
- Esteban, R., Fujimura, T. and Wickner, R. (1989) Internal and terminal cis-acting sites are necessary for in vitro replication of the L-A double-stranded RNA virus of yeast. *EMBO J.*, **8**, 947-954.
- Estes, M. (1996) Rotaviruses and their replication. In B.Fields, D.M.K.a. (ed.) *Virology*. Raven Press, New York, NY, Vol. 2, pp. 1329-1352.
- Estes, M., Graham, D. and Mason, B. (1981) Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: Molecular mechanism. *J.Virol.*, **39**, 879-888.

- Estes, M.K. and Cohen, J. (1989) Rotavirus gene structure and function. *Microbiological Reviews*, **53**, 410-449.
- Fabbretti, E., Afrikanova, I., Vascotto, F. and Burrone, O. (1999) Two non structural rotavirus proteins, NSP2 and NSP5, form viroplasm-like structures in vivo. *J.Gen.Virol.*, **80**, 333-339.
- Fiore, L., Greenberg, H. and Mackow, E. (1991) The VP8\* fragment of VP4 is the rhesus rotavirus hemagglutinin. *Virology*, **181**, 553-563.
- Fujimura, T., Esteban, R., Esteban, L.M. and Wickner, R.B. (1990) Portable Encapsidation Signal of the L-A Double-Stranded RNA Virus of *S.cerevisiae*. *Cell*, **62**, 819-828.
- Fujimura, T. and Wickner, R.B. (1988) Replicase of L-A Virus-like Particles of *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.*, **263**, 454-460.
- Fujimura, T. and Wickner, R.B. (1989) Reconstitution of Template-dependent in Vitro Transcriptase Activity of a Yeast Double-stranded RNA Virus\*. *J.Biol.Chem.*, **264**, 10872-10877.
- Fukuhara, N., Nishikawa, K., Gorziglia, M. and Kapikian, A.Z. (1989) Nucleotide sequence of gene segment 1 of a porcine rotavirus strain. *Virology*, **173**, 743-749.
- Gallegos, C.O. and Patton, J.T. (1989) Characterization of rotavirus replication intermediates: a model for the assemble of single-shelled particles. *Virology*, **172**, 616-627.
- Gómez, J.A., Biscotti, E.L., Bercovich, J.A. and Grinstein, S. (1986) Epidemiology of Human Rotaviruses in Argentina as determined by RNA genome electrophoresis. *Intervirology*, **26**, 174-180.
- Gómez, J.A., Estes, M.K., Matson, D.O., Bellinzoni, R., Alvarez, A. and Grinstein, S. (1990) Serotyping of Human Rotaviruses in Argentina by ELISA with monoclonal antibodies. *Arch.Virol.*, **112**, 249-259.
- González, S.A. and Burrone, O.R. (1991) Rotavirus NS26 is modified by addition of single O-linked residues of N-acetylglucosamine. *Virology*, **182**, 8-16.
- González, S.A., Mattion, N.M., Bellinzoni, R. and Burrone, O.R. (1989) Structure of rearranged genome segment II in two different rotavirus strains generated by a similar mechanism. *J.Gen.Virol.*, **70**, 1329-1336.
- Gorziglia, M., Hoshino, Y., Nishikawa, K., Maloy, W.L., Jones, R.W., Kapikian, A.Z. and Chanock, R.M. (1988) Comparative sequence analysis of the genomic segment 6 of four rotaviruses each with a different subgroup specificity. *J.Gen.Virol.*, **69**, 1659-1669.
- Gorziglia, M. and Kapikian, A.Z. (1992) Expression of the OSU rotavirus outer capsid protein VP4 by an adenovirus recombinant. *J.Virol.*, **66**, 4407-4412.
- Gorziglia, M., Larralde, G., Kapikian, A.Z. and Chanock, R.M. (1990) Antigenic relationships among human rotaviruses as determined by outer capsid protein VP4. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **87**, 7155-7159.
- Gorziglia, M., Nishikawa, K. and Fukuhara, N. (1989) Evidence of duplication and deletion in supershort segment II of Rabbit Rotavirus Alabama Strain. *Virology*, **170**, 587-590.
- Gorziglia, M.I. and Collins, P.L. (1992) Intracellular amplification and expression of a synthetic analog of rotavirus genomic RNA bearing a foreign marker gene: Mapping cis-acting nucleotides in the 3'-noncoding region. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **89**, 5784- 5788.
- Gottlieb, P., Qiao, X., Strassman, J., Frilander, M. and Mindich, L. (1994) Identification of the packaging regions within the genomic RNA segments of bacteriophage  $\phi$  6. *Virology*, **200**, 42-47.
- Gottlieb, P., Strassman, J., Qiao, X., Frucht, A. and Mindich, L. (1990) In Vitro Replication, Packaging, and Transcription of the Segmented Double-Stranded RNA

Genome of Bacteriophage  $\phi$  6: Studies with Procapsids Assembled from Plasmid-Encoded Proteins. *J.Bacteriol.*, **172**, 5774-5782.

Graham, A., Kudesia, G., Allen, A.M. and Desselberger, U. (1987) Reassortment of human rotavirus possessing genome rearrangements with bovine rotavirus: evidence for host cell selection. *J.Gen.Virol.*, **68**, 115-122.

Graham, F.L. (1990) Adenoviruses as expression vectors and recombinant vaccines. *Trends in Biotechnology*, **8**, 85-87.

Green, K.Y., Sarasini, A., Qian, Y. and Gema, G. (1992) Genetic variation in rotavirus serotype 4 subtypes. *Virology*, **188**, 362-368.

Grimwood, K., Lund, J.C.S., Coulson, B.S., Houdson, I.L., Bishop, R.F. and Barnes, G.L. (1988) Comparison of serum and mucosal antibody responses following severe acute rotavirus gastroenteritis in young children. *J.Clin.Microbiol.*, **26**, 732-738.

Hua, J., Chen, X. and Patton, J.T. (1994) Deletion mapping of the rotavirus metalloprotein NS53 (NSPI): the conserved cysteine-rich region is essential for virus-specific RNA binding. *J.Virol.*, **68**, 3990-4000.

Hua, J., Mansell, E.A. and Patton, J.T. (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**, 372-378.

Hua, J. and Patton, J.T. (1994) The carboxyl-half of the rotavirus nonstructural protein NS53 (NSPI) is not required for virus replication. *Virology*, **198**, 567-576.

Huang, T.S., Palese, P. and Krystal, M. (1990) Determination of Influenza Virus Proteins Required for Genome Replication. *J.Virol.*, **64**, 5669-5673.

Hundley, F., Biryahwaho, B., Gow, M. and Desselberger, U. (1985) Genome rearrangements of bovine rotavirus after serial passage at high multiplicity of infection. *Virology*, **143**, 88-103.

Hundley, F., McIntyre, M., Clark, B., Beards, G., Wood, D., Chrystie, I. and Desselberger, U. (1987) Heterogeneity of genome rearrangements in rotaviruses isolated from a chronically infected immunodeficient child. *J.Virol.*, **61**, 3365-3372.

Hung, T., Chen, G., Wang, C. and al. (1984) Waterborne outbreak of rotavirus diarrhea in adults in China caused by a novel rotavirus. *Lancet*, **i**, 1139-1142.

Imai, M., Akatami, K., Ikegami, N. and Furuichi, Y. (1983) Capped and conserved terminal structures in human rotavirus genome double-stranded RNA segments. *J.Virol*, **47**, 125-136.

Isa, P., López, S., Segovia, L. and Arias, C. (1997) Functional and structural analysis of the sialic acid-binding domain of rotavirus. *J.Virol.*, **71**, 6749-6756.

Jennings, P.A., Finch, J.T., Winter, G. and Robertson, J.S. (1983) Does the higher order structure of the influenza virus ribonucleoprotein guide sequence rearrangements in influenza viral RNA. *Cell*, **34**, 619-627.

Kalica, A.R., Sereno, M.M., Wyatt, R.G., Mebus, C.A., Chanock, R.M. and Kapikian, A.Z. (1978) Comparison of human and animal rotavirus strains by gel electrophoresis of viral RNA. *Virology*, **87**, 247-255.

Kaljot, K.T., Shaw, R.D., Rubin, D.H. and Greenberg, H.B. (1988) Infectious rotavirus enters cells by direct cell membrane penetration, not by endocytosis. *J.Virol.*, **62**, 1136-1144.

Kapikian, A.Z. and Chanock, R.M. (1990) Rotaviruses. In Fields, B.N., Knipe, D.M. (ed.) *Virology*. Raven Press, Ltd., New York, N.Y., Vol. 2, pp. 1353-1404.

Kattoura, M.D., Clapp, L.L. and Patton, J.T. (1992) The rotavirus nonstructural protein, NS35, possesses RNA-binding activity in vitro and in vivo. *Virology*, **191**, 698-708.

- Kirkegaard, K. and Baltimore, D. (1986) The mechanism of RNA recombination in poliovirus. *Cell*, **47**, 433-443.
- Kohli, E., Maurice, L., Vautherot, J.F., Bourgeois, C., Bour, J.B., Cohen, J. and Pothier, P. (1992) Localization of group specific epitopes on the major capsid protein of group A rotavirus. *J.Gen.Virol.*, **73**, 907-914.
- Kojima, K., Taniguchi, K., Urasawa, T. and Urasawa, S. (1996) Sequence analysis of normal and rearranged NSP5 genes from human rotavirus strains isolated in nature: implications of the occurrence of the rearrangement at the step of plus strand synthesis. *Virology*, **224**, 446-452.
- Labbé, M., Baudoux, P., Charpilienne, A., Poncet, D. and Cohen, J. (1994) Identification of the nucleic acid binding domain of the rotavirus VP2 protein. *J.Gen.Virol.*, **75**, 3423-3430.
- Labbé, M., Charpilienne, A., Crawford, S.E., Estes, M.K. and Cohen, J. (1991) Expression of rotavirus VP2 produce empty coelike particles. *J.Virol.*, **65**, 2946-2952.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Larralde, G. and Gorziglia, M. (1992) Distribution of conserved and specific epitopes on the rotavirus VP8 \* subunit of rotavirus VP4. *J.Virol.*, **66**, 7438-7443.
- Larralde, G., Li, B., Kapikian, A.Z. and Gorziglia, M. (1991) Serotype-specific epitope(s) present on the VP8 subunit of VP4 protein. *J.Virol.*, **65**, 3213-3218.
- LeBaron, C.W., Furutan, N.P., Lew, J.F., Allen, J.R., Gouvea, V., Moe, C. and Monroe, S.S. (1990) Viral agents of gastroenteritis: public health importance and outbreak management. *Morbid.Mortal.Weekly Rep.*, **39(N°RR-5)**, 1-24.
- Liljeström, P. and Garoff, H. (1991) A new generation of animal cell expression vectors based on the Semliki Forest Virus Replicon. *Bio/Technology*, **9**, 1356-1361.
- Liu, M., Mattion, N.M. and Estes, M.K. (1992) Rotavirus VP3 expressed in insect cells possesses guanylyltransferase activity. *Virology*, **188**, 77-84.
- London, S.D., Schmaljohn, A.L., Dalrymple, J.M. and Rice, C.M. (1992) Infectious enveloped RNA virus antigenic chimeras. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **88**, 207-211.
- López, S. and Arias, C.F. (1993) Protein NS26 is highly conserved among porcine rotavirus strains. *Nucleic Acid Res.*, **21**, 1042.
- Ludert, J., Feng, N., Yu, J., Broom, R., Hoshino, Y. and Greenberg, H. (1996) Genetic mapping indicates that VP4 is the rotavirus cell attachment protein *in vitro* and *in vivo*. *J.Virol.*, **70**, 487-493.
- Luna, S., Martin, J., Portela, A. and Ortín, J. (1993) Influenza virus naked RNA can be expressed upon transfection into cells co-expressing the three subunits of the polymerase and the nucleoprotein from simian virus 40 recombinant viruses. *J.Gen.Virol.*, **74**, 535-539.
- Luytjes, W., Krystal, M., Enami, M., Parvin, J.D. and Palese, P. (1989) Amplification, expression and packaging of a foreign gene by influenza virus. *Cell*, **59**, 1107-1113.
- Maas, D. and Atkinson, P. (1994) Retention by the endoplasmic reticulum of rotavirus VP7 is controlled by three adjacent amino-terminal residues. *J.Virol.*, **68**, 366-378.
- Maas, D.R. and Atkinson, P.H. (1990) Rotavirus proteins VP7, NS28 and VP4 form oligomeric structures. *J.Virol.*, **64**, 2632-2641.
- Mackett, M. and Smith, G.L. (1986) Vaccinia Virus Expression Vectors. *J.Gen.Virol.*, **67**, 2067-2082.
- Makino, S., Keck, J.G., Stohlman, S.A. and Lai, M.M.C. (1986) High frequency RNA recombination of murine coronaviruses. *J.Virol.*, **57**, 729-737.



- Mansell, E.A. and Patton, J.T. (1990) Rotavirus RNA replication: VP2, but not VP6, is necessary for viral replicase activity. *J. Virol.*, **64**, 4988-4996.
- Mason, B.B., Graham, D.Y. and Estes, M.K. (1980) In vitro transcription and translation of simian rotavirus SA11 gene products. *J. Virol.*, **33**, 1111-1121.
- Matsui, S.M., Mackow, E.R., Matsuno, S., Paul, P.S. and Greenberg, H.B. (1990) Sequence analysis of Gene 11 equivalents from "Short" and "Super Short" Strains of Rotavirus. *J. Virol.*, **64**, 120-124.
- Mattion, N.M., Bellinzoni, R.C., Blackhall, J.O., Estes, M.K., González, S.A., La Torre, J.L. and Scodeller, E.A. (1990) Genomes rearrangements in porcine rotaviruses: biochemical and biological comparisons between a supershort strain and its standard counterpart. *J. Gen. Virol.*, **71**, 355-362.
- Mattion, N.M., Cohen, J., Aponte, C. and 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. and Estes, M.K. (1994) The Rotavirus Proteins. In Ed, A.K. (ed.) *Viral Infections of the Gastrointestinal Tract*. M.Dekker, Inc, New York, pp. 169-249.
- Mattion, N.M., Mitchell, D.B., Both, G.W. and Estes, M.K. (1991) Expression of rotavirus proteins encoded by alternative open reading frames of genome segment 11. *Virology*, **181**, 295-304.
- McIntyre, M., Rosenbaum, V., Rappold, W., Desselberger, M., Wood, D. and Desselberger, U. (1987) Biophysical characterization of rotavirus particles containing rearranged genomes. *J. Gen. Virol.*, **68**, 2961-2966.
- Méndez, E., Arias, C.F. and López, S. (1992) Genomic rearrangements in human rotavirus strain Wa; analysis of rearranged segment 7. *Arch. Virol.*, **125**, 331-338.
- Méndez, E., López, S., Cuadras, M., Romero, P. and Arias, C. (1999) Entry of rotaviruses is a multistep process. *Virology*, **263**, 450-459.
- Meyer, J.C., Bergmann, C.C. and Bellamy, A.R. (1989) Interaction of rotavirus cores with the nonstructural glycoprotein NS28. *Virology*, **170**, 98-107.
- Miller, A.D. and Rosman, G.J. (1989) Improved Retroviral Vectors for Gene Transfer and Expression. *BioTechniques*, **7**, 980-990.
- Miller, L. (1988) Baculoviruses as gene expression vectors. *Annu. Rev. Microbiol.*, **42**, 177-179.
- Mindich, L., Qiao, X., Onodera, S., Gottlieb, P. and Strassman, J. (1992) Heterologous Recombination in the Double-Stranded RNA Bacteriophage  $\phi$  6. *J. Virol.*, **66**, 2605-2610.
- Morin, J., E, Lubeck, M.D., Barton, J.E., Conley, A.J., Davis, A.R. and Hung, P.P. (1987) Recombinant adenoviruses induced antibody response to hepatitis B virus surface antigen in hamsters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 4626-4630.
- Moss, B. (1991) Vaccinia Virus: A Tool for Research and Vaccine Development. *Science*, **252**, 1662-1667.
- Nagesha, H.S., Huang, J., Hum, C.P. and Holmes, I.H. (1990) A porcine rotavirus strain with dual VP7 serotype specificity. *Virology*, **175**, 319-322.
- Newton, K., Meyer, J., Bellamy, A. and Taylor, J. (1997) Rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 alters plasma membrane permeability in mammalian cells. *J. Virol.*, **71**, 9458-9465.
- Nuss, D.L. (1988) Deletion mutants of double-stranded RNA genetic elements found in plants and fungi. In Domingo, E., Holland, J.J. and Alquist, P. (eds.), *RNA Genetics*. CRC Press, Boca Raton, FL, Vol. 2, pp. 187-210.

- Nuttall, S.D., Hum, C.P., Holmes, I.H. and Dyal-Smith, M.L. (1989) Sequences of VP9 genes from short and supershort rotavirus strains. *Virology*, **171**, 453-457.
- O'Brien, J., Taylor, J. and Bellamy, A. (2000) Probing the structure of rotavirus NSP4: a short sequence at the extreme C terminus mediates binding to the inner capsid particle. *J.Virol.*, **74**, 5388-5394.
- Offit, P.A. and Dudzik, K.I. (1989) Rotavirus-specific cytotoxic T lymphocytes appear at the intestinal mucosal surface after rotavirus infection. *J.Immunol.*, **63**, 3507-3512.
- Olkkonen, V.M., Gottlieb, P., Strassman, J., Qiao, X., Bamford, D.H. and Mindich, L. (1990) In vitro assembly of infectious nucleocapsids of bacteriophage  $\phi$ 6: Formation of a recombinant double-stranded RNA virus. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **87**, 9173-9177.
- Palombo, E.A., Bugg, H.C. and Bishop, R.F. (1998) Characterisation of rearranged NSP5 gene of human rotavirus. *Acta Virol.*, **42**, 55-59.
- Park, K., Huang, T., Correia, F. and Krystal, M. (1991) Rescue of a foreign gene by Sendai virus. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **88**, 5537-5541.
- Pattnaik, A.K., Ball, A.L., LeGrone, A.W. and Wertz, G.W. (1992) Infectious defectives interfering particles of VSV from transcripts of a cDNA clone. *Cell*, **69**, 1011-1020.
- Patton, J. (1995) Structure and function of the rotavirus RNA-binding proteins. *J.Gen.Virol.*, **76**, 2633-2644.
- Patton, J. and Chen, D. (1999) RNA-binding and capping activities of proteins in rotavirus open cores. *J.Virol.*, **73**, 1382-1391.
- Patton, J., Chnaiderman, J. and Spencer, E. (1999) Open reading frame in rotavirus mRNA specifically promotes synthesis of double strand RNA: template size also affects replication efficiency. *Virology*, **264**, 167-180.
- Patton, J., Wentz, M., Xiaobo, J. and Ramig, F. (1996) cis-Acting signals that promote genome replication in rotavirus mRNA. *J.Virol.*, **70**, 3961-3971.
- Patton, J.T. (1986) Synthesis of simian rotavirus SA11 double-stranded RNA in a cell free system. *Virus Res.*, **6**, 217-233.
- Patton, J.T. and Gallegos, C.O. (1988) Structure and protein composition of the rotavirus replicase particle. *Virology*, **166**, 358-365.
- Patton, J.T., Jones, M.T., Kalbach, A.N., He, Y.-W. and Xiaobo, J. (1997) Rotavirus RNA polymerase requires the core shell protein to synthesize the double-stranded RNA genome. *J.Virol.*, **71**, 9618-9626.
- Patton, J.T., Salter-Cid, L., Kalbach, A., Mansell, E.A. and Kattoura, M. (1993) Nucleotide and amino acid sequence analysis of the rotavirus nonstructural RNA-binding protein NS35. *Virology*, **192**, 438-446.
- Pedley, S., Hundley, F., Chrystie, I., McCrae, M.A. and Desselberger, U. (1984) The genomes of rotaviruses isolated from chronically infected immunodeficient children. *J.Gen.Virol.*, **65**, 1141-1150.
- Piron, M., Delaunay, T., Grouscloade, J. and Poncet, D. (1999) Identification of the RNA-binding, dimerization and the eIF4GI-binding domains of rotavirus NSP3. *J.Virol.*, **73**, 5411-5421.
- Piron, M., Vende, P., Cohen, J. and Poncet, D. (1998) Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4GI and evicts the poly(A) binding protein from the eIF4F. *EMBO J.*, **13**, 5811-5821.
- Pizarro, J.L., Sandino, A.M., Pizarro, J.M., Fernández, J. and Spencer, E. (1991) Characterization of rotavirus guanylyltransferase activity associated with polypeptide VP3. *J.Gen.Virol.*, **72**, 325-332.

- Poch, O., Sauvaget, I., Delarue, M. and Tordo, N. (1989) Identification of four conserved motifs among RNA-dependent polymerase encoding elements. *EMBO J.*, **8**, 3867-3874.
- Pocock, D.H. (1987) Isolation and characterization of two group A rotaviruses with unusual genome profiles. *J.Gen.Virol.*, **68**, 653-660.
- Poncet, D., Aponte, C. and Cohen, J. (1993) Rotavirus protein NSP3 (NS34) is bound to the 3' consensus sequence of viral mRNA in infected cells. *J.Virol.*, **67**, 3159-3165.
- Poncet, D., Laurent, S. and Cohen, J. (1994) Four nucleotides are the minimal requirement for RNA recognition by rotavirus non-structural protein NSP3. *EMBO J.*, **13**, 4165-4173.
- Poncet, D., Lindenbaum, P., L'Haridon, R. and Cohen, J. (1997) In vivo and in vitro phosphorylation of rotavirus NSP5 correlates with its localization in viroplasms. *J.Virol.*, **71**, 34-41.
- Poruchynsky, M.S. and Atkinson, P.H. (1991) Rotavirus protein rearrangements in purified membrane-enveloped intermediate particles. *J.Virol.*, **65**, 4720-4727.
- Prasad, B.V.V., Burns, J.W., Marietta, E., Estes, M.K. and Chiu, W. (1990) Localization of VP4 neutralization sites in rotavirus by three-dimensional cryo-electron microscopy. *Nature*, **343**, 476-479.
- Prasad, B.V.V. and Chiu, W. (1993) Structure of rotavirus. *Curr.Top.Microbiol.Immunol*, **185**, 285-335.
- Qian, Y. and Green, K.Y. (1991) Human rotavirus strain 69M has a unique VP4 as determined by amino acid sequence analysis. *Virology*, **182**, 407-412.
- Racaniello, V.R. and Baltimore, D. (1981) Cloned poliovirus cDNA is infectious in mammalian cells. *Science*, **214**, 916-919.
- Ready, K.F. and Sabaara, M. (1987) In vitro assembly of bovine rotavirus nucleocapsid protein. *Virology*, **157**, 189-198.
- Roizman, B. and Jenkins, F.J. (1985) Genetic Engineering of Novel Genomes of Large DNA Viruses. *Science*, **229**, 1208-1214.
- Roner, M.R., Stuphin, L.A. and Joklik, W.K. (1990) Reovirus RNA is Infectious. *Virology*, **179**, 845-852.
- Ruiz, M., Abad, M., Charpilienne, A., Cohen, J. and Michelangeli, F. (1997) Cell lines susceptible to infection are permeabilized by cleaved and solubilized outer layer proteins of rotavirus. *J.Virol.*, **71**, 9458-9465.
- Russell, S.J., Brandenburger, A., Flemming, C.L., Collins, M.K.L. and Rommelare, J. (1992) Transformation-Dependent Expression of Interleukine Genes Delivered by a Recombinant Parvovirus. *J.Virol.*, **66**, 2821-2828.
- Saif, L. and Jiang, B. (1993) Nongroup A rotavirus of human and animals. *Curr.Top.Microbiol.Immunol*, **185**, 339-371.
- Sambrook, J., Fritsch, E. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour, New York.
- Scheiflinger, F., Dorner, F. and Falkner, F.G. (1992) Construction of chimeric vaccinia viruses by molecular cloning and packaging. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **89**, 9977-9981.
- Scott, G.E., Tarlow, O. and McCrae, M.A. (1989) Detailed structural analysis of a genome rearrangement in bovine rotavirus. *Virus Res.*, **14**, 119-128.
- Sereno, M.M. and Gorziglia, M.I. (1994) The outer capsid protein VP4 of murine rotavirus strain Eb represents a tentative new P type. *Virology*, **199**, 500-504.
- Shaw, A.L., Rothnagel, R., Chen, D., Ramig, R.F., Chiu, W. and Venkataram Prasad, B.V. (1993) Three-dimensional visualization of the rotavirus hemagglutinin structure. *Cell*, **74**, 693-701.

- Shaw, A.L., Rothnagel, R., Zeng, C.Q.-Y., Lawton, J.A., Ramig, R.F., Estes, M.K. and Venkataram Prasad, B.V. (1996) Rotavirus structure: interactions between the structural proteins. *Arch.Virol.*, **12**, 21-27.
- Shen, S., Burke, B. and Desselberger, U. (1994) Rearrangement of the VP6 gene of a group A rotavirus in combination with a point mutation affecting trimer stability. *J.Virol.*, **68**, 1682-1688.
- Snodgrass, D., Fitzgerald, T., Campbell, I., Scott, F., Browning, G., Miller, D., Herring, A. and Greenberg, H. (1990) Rotavirus serotypes 6 and 10 predominate in cattle. *J.Clin.Microbiol.*, **28**, 504-507.
- Spaete, R.R. and Mockarski, E.S. (1987) Insertion and deletion mutagenesis of the human cytomegalovirus genome. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **84**, 7213-7217.
- Steinhauer, D., Domingo, E. and Holland, J. (1992) Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA virus polymerase. *Gene*, **122**, 281-288.
- Steinhauer, D.A. and Holland, J.J. (1987) Rapid evolution of RNA viruses. *Ann.Rev.Microbiol.*, **41**, 409-433.
- Stirzaker, S.C. and Both, G.W. (1989) The signal peptide of the rotavirus glycoprotein VP7 is essential for its retention in the ER as an integral membrane protein. *Cell*, **56**, 741-747.
- Strauss, J. and Strauss, E. (1988) Evolution of RNA viruses. *Ann.Rev.Microbiol.*, **42**, 657-683.
- Suzuki, H., Kitaoka, S., Konno, T., Sato, T. and Ishida, N. (1985) Two modes of human rotavirus entry into MA104 cells. *Arch.Virol.*, **85**, 25-34.
- Tanaka, T.N., Conner, M.E., Graham, D.Y. and Estes, M.K. (1988) Molecular characterization of three rabbit rotavirus strains. *Arch.Virol.*, **98**, 253-265.
- Taniguchi, K., Kojima, K. and Urasawa, S. (1996) Nondefective rotavirus mutants with an NSP1 gene which has a deletion of 500 nucleotides, including a cystein-rich zing finger motif-encoding region (nucleotides 156-248), or which has a nonsense codon at nucleotides 153 to 155. *J.Virol.*, **70**, 4125-4130.
- Taylor, J.A., Meyer, J.C., Legge, M.A., O'Brien, J.A., Street, J.E., Lord, V.J., Bergmann, C.C. and Bellamy, A.R. (1992) Transient expression and mutational analysis of the rotavirus intracellular receptor\_ The C-terminal methionine residue is essential for ligand binding. *J.Virol.*, **66**, 3566-3572.
- Tian, P., Ball, J., Zeng, C. and Estes, M. (1996) The rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 possesses membrane destabilization activity. *J.Virol.*, **70**, 6973-6981.
- Tian, P., Estes, M., Hu, Y., Ball, J., Zeng, C. and Schilling, W. (1995) The rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 mobilizes Ca<sup>2+</sup> from the endoplasmic reticulum. *J.Virol.*, **69**, 5763-5772.
- Tian, Y., Tarlow, O., Ballard, A., Desselberger, U. and McCrae, M.A. (1993) Genomic Concatemerization/Deletion in Rotaviruses: a New Mechanism for generating Rapid Genetic Change of Potential Epidemiological Importance. *J.Virol*, **67**, 6625-6632.
- Valenzuela, S., Pizarro, J.M., Sandino, A.M., Vásquez, M., Fernández, J., Hernández, O., Patton, J. and Spencer, E. (1991) Photoaffinity labeling of rotavirus VP1 with 8-azido-ATP: identification of the viral RNA polymerase. *J.Virol.*, **65**, 3964-3967.
- Vende, P., Piron, M., Castagne, N. and Poncet, D. (2000) Efficient translation of rotavirus mRNA requires simultaneous interaction of NSP3 with the eukaryotic translation initiation factor eIF4G and the mRNA 3' end. *J.Virol.*, **74**, 7064-7071.
- Vesikari, T., Isolauri, E., Ruuska, T. and Rautanen, T. (1987) Clinical trials of rotavirus vaccines. In G.Bock and J.Welan (eds.), *Novel diarrhoea viruses (CIBA Foundation Symposium 128)*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK, pp. 218-237.

- Welch, S.K., Crawford, S.E. and Estes, M.K. (1989) Rotavirus SA11 genome segment 11 is a non structural phosphoprotein. *J.Virol.*, **63**, 3974-3982.
- Wentz, M., Patton, J. and Ramig, R. (1996) The 3'-terminal consensus sequence of rotavirus mRNA is the minimal promoter of negative-strand RNA synthesis. *J.Virol.*, **70**, 7833-7841.
- Wickner, R. (1993) Double-stranded RNA virus replication and packaging. *J.Biol.Chem.*, **268**, 3797-3800.
- Yeager, M., Berriman, J.A., Baker, T.S. and Bellamy, A.R. (1994) Three-dimensional structure of the rotavirus hemagglutinin VP4 by cryo-electron microscopy and difference map analysis. *Embo J.*, **13**, 1011-1018.
- Yeager, M., Dryden, K.A., Olson, N.H., Greenberg, H.B. and Baker, T.S. (1990) Three-dimensional structure of Rhesus rotavirus by cryo-electron microscopy and image reconstruction. *J.Cell Biol.*, **110**, 2133-2144.
- Zeng, C., Estes, M., Charpilienne, A. and Cohen, J. (1998) The N terminus of rotavirus VP2 is necessary for encapsidation of VP1 and VP3. *J.Virol.*, **72**, 201-208.
- Zeng, C.Q.-Y., Wentz, M.J., Cohen, J., Estes, M.K. and Ramig, R.F. (1996) Characterization and replicase activity of double-layered and single-layered rotavirus-like particles expressed from baculovirus recombinants. *J.Virol.*, **70**, 2736-2742.
- Zou, S. and Brown, E.G. (1992) Identification of sequence elements containing signals for replication and encapsidation of the reovirus M1 genome segment. *Virology*, **186**, 377-388.