



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"Inhibición de la expresión del gen 11 de rotavirus por medio de siRNAs"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A:
ROJAS JACINTO MARGARITO



DIRECTOR DE TESIS: DR. TOMAS DAVID LOPEZ DIAZ



2004

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Rojas Jacinto

Margarito

FECHA: 17-05-04

FIRMA: [Signature]

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Inhibición de la expresión del gen 11 de rotavirus por medio de siRNAs"

realizado por Margarito Rojas Jacinto

con número de cuenta 9720513-7 , quien cubrió los créditos de la carrera de:

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dr. Tomás David López Díaz

Propietario

Dra. Patricia Ileana Joseph Bravo

Propietario

Dr. José Luis Puente García

Suplente

Dra. Patricia Ramos Morales

Suplente

Dra. Alicia Negrón Mendoza

Consejo Departamental de Biología

[Signature]
M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Genética y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Tomás D. López. Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo de una beca económica para alimentación y hospedaje otorgada por el Instituto de Biotecnología.

*Dedicada a mis padres Tomás y Claudia y a mis hermanos
Claudia, Leticia, Francisco y Araceli. Por todo su cariño,
comprensión y apoyo*

Agradecimientos.

Al Dr. Tomás David López por, su asesoría, su paciencia y por el tiempo dedicado a este trabajo.

A los Drs. Carlos Arias y Susana López, por su apoyo y sugerencias durante la realización de este trabajo.

A mis sinodales: Dr. José Luis Puente, Dra. Patricia Ramos, Dra. Patricia Joseph y Dra. Alicia Negrón, por aceptar revisar mi tesis, por sus comentarios y sugerencias.

A todo el grupo Arias/López: Hilda, Vanesa, Tomás, Miriam, Margara, Mauricio, Ernesto, Tere, Pavel, Marisol, Jimena, Mery, Diana, Jesús, Gaby, Pedro, Rafa, Camilo, Liliana, Claudia, Carlos Estrada, Ameyalí, Minerva, por que hacen cada día más agradable.

A mis amigos: Rebe, Adriana (ñoñanin), Emmanuelo, Carola, Yessenia, Fabiolina, Alex, Bianca, Rocío, Arlette, Eduardo, Alma, Idalia, Dulcecita, Paty, Alejandro, Arturo, Mauricio, Lucero, Salvador, Israel, Ivonne, Deysi, Lupis, Daniel, David, Marco, Carlos, Oscar y todos los que me faltaron.

Índice

| | Página |
|--------------------------------|--------|
| Abreviaturas | vi |
| Resumen | 1 |
| Introducción | 3 |
| Patogénesis viral | 3 |
| Generalidades de los rotavirus | 6 |
| Genoma viral | 8 |
| Proteínas estructurales | 8 |
| Proteínas no estructurales | 11 |
| Ciclo replicativo de Rotavirus | 16 |
| La interferencia por siRNAs | 19 |
| Justificación | 23 |
| Objetivo | 24 |
| Hipótesis | 24 |
| Material y Métodos | 25 |
| Resultados | 36 |
| Discusión | 48 |
| Conclusiones | 52 |
| Perspectivas | 53 |
| Bibliografía | 54 |

Resumen

Los Rotavirus pertenecen a la familia *Reoviridae* y son la causa principal de gastroenteritis en niños menores de 3 años. Están formados de tres capas concéntricas de proteínas. El núcleo del virión encierra un genoma de 11 segmentos de RNA de doble cadena (RNAdc), que codifican para 6 proteínas estructurales y 6 no estructurales. La replicación, empaquetamiento del RNAdc y ensamble de partículas de dos capas (DLPs) ocurre en el citoplasma en estructuras llamadas viroplasmos. Una proteína importante en la formación de estas estructuras es NSP5 una fosfoproteína codificada por el gen 11. Para estudiar la función de NSP5 la cual no se conoce, silenciamos el gen 11 utilizando el sistema de interferencia por RNA (RNAi). Para ello se diseñó el siNSP5 a partir de la secuencia del gen 11 del rotavirus RRV (rotavirus de simio). El siNSP5 se transfectó en monocapas de la línea celular MA104 derivadas de riñón de mono *Rhesus*, antes de la infección con RRV. En el análisis de estas células por western-blot se observó reducción en la síntesis de NSP5, lo cual indica la inhibición de la expresión del gen 11, este efecto sólo se observó en células infectadas con RRV y no en células infectadas con la cepa Wa (rotavirus humano), lo cual indica una inhibición específica. La síntesis de otras proteínas virales también se redujo, el rendimiento viral fue 70% inferior a las células tratadas con un siRNA control. Por geles de poliacrilamida observamos disminución en la síntesis de RNAdc. Ensayos de inmunofluorescencia mostraron reducción en el número y tamaño de viroplasmos y cambios en la distribución normal de las proteínas VP4, VP6 y NSP4, las cuales formaron estructuras filamentosas que no colocalizan con actina, tubulina o vimentina. La producción de partículas virales purificadas por gradientes de CsCl disminuye; sin embargo, la cantidad de cápsides sin RNAdc aumenta. Concluimos que el siNSP5 inhibe específicamente la expresión del gen 11 de RRV, lo que conduce a la

inhibición de la síntesis de NSP5, que a su vez provoca reducción en el tamaño y número de viroplasmos, evento que puede explicar la reducción en la producción de genoma viral y la reducción en la formación de partículas virales infecciosas, ya que en los viroplasmos se lleva a cabo la replicación del genoma e inicio de la morfogénesis viral. Se ha propuesto que en los viroplasmos se lleva a cabo la transcripción secundaria de los RNAm, lo cual explicaría la reducción en la síntesis de todas las proteínas virales. Alternativamente NSP5 podría tener un papel regulador en la síntesis de proteínas y RNAdc o bien la ausencia de NSP5 ó NSP6 podría afectar de forma directa o indirecta modulando la función de alguna(s) proteína(s) encargada(s) de dicho proceso.

Introducción

Patogénesis viral.

Los rotavirus representan el principal agente etiológico que causa gastroenteritis viral en niños menores de 2 años y en las en las crías de muchas especies animales, incluyendo algunas de importancia económica para el hombre (44).

La infección por rotavirus es muy común, se ha observado que a la edad de 5 años, el 95% de los niños ya han sido infectados. En países en desarrollo los rotavirus son causantes de 37-70% de las hospitalizaciones por diarrea severa, lo cual resulta en aproximadamente 800,000 muertes anuales por deshidratación en niños menores de 2 años. El pico de incidencia de la infección por rotavirus ocurre entre los 6 y 24 meses de edad. La infección en adultos es por lo regular asintomática, aunque ocasionalmente se presentan los síntomas en los padres de niños infectados, en pacientes inmunocomprometidos y en adultos de la tercera edad. Estas datos apoyan la necesidad de desarrollar un vacuna segura y efectiva contra rotavirus (44).

Una vez que este virus infecta a los infantes, el periodo de incubación oscila entre 24 y 48 h. Los rotavirus causan una enfermedad que se caracteriza por diarreas crónicas, fiebre, vómito y deshidratación, con una duración aproximada de una semana. La severidad de la enfermedad varía desde una infección asintomática hasta una gastroenteritis deshidratante severa que puede llevar a la muerte. En el zenit de la enfermedad la producción de virus por alcanza las 10^{11} partículas/mL. La necrosis de los

enterocitos reduce la digestión, causando diarrea. La infección aguda por rotavirus es seguida por una respuesta humoral que comprende a las inmunoglobulinas IgM, IgG, IgA y a células T en el intestino delgado (13).

Los anticuerpos maternos de clase IgG transmitidos a través de la placenta, no protegen al recién nacido contra la enfermedad, pero los recién nacidos alimentados con leche materna presentan una protección parcial contra las infecciones de rotavirus, posiblemente mediante los anticuerpos específicos tipo IgA transmitidos por la madre. Sin embargo, estos anticuerpos tienen una vida media muy corta. La lactancia materna parece posponer la infección por rotavirus hasta después de los seis meses de edad, pero la epidemiología de la enfermedad sugiere que la inmunidad natural proviene de las reinfecciones por estos virus (13).

Dado que niños con inmunodeficiencias en células T y B pueden desarrollar infecciones crónicas por rotavirus, además de síntomas prolongados e infecciones extraintestinales, es claro que tanto las células T como B son importantes para la inmunidad contra rotavirus. No obstante las células T y B inducidas por una infección natural son insuficientes en muchos casos para prevenir infecciones sintomáticas o asintomáticas en niños o adultos. La severidad y número de infecciones disminuye con la edad, lo que sugiere que existe inmunidad protectora contra rotavirus, que se va desarrollando gradualmente (13).

El tropismo de los rotavirus está limitado a los enterocitos maduros localizados en las puntas de las vellosidades del intestino delgado, causando descamación y muerte celular.

Se ha propuesto que la diarrea causada por estos virus es consecuencia de la destrucción de éstos (13). Sin embargo, recientemente se ha propuesto que, al menos en parte la diarrea es causada por la proteína no estructural NSP4 que estimula la secreción transepitelial de cloro, por una vía dependiente de calcio, lo que desequilibra el balance iónico de la célula y provoca la salida de agua. Aparentemente, todo esto sucede previo a la destrucción del epitelio intestinal por la replicación viral (44).

La principal ruta de transmisión de los rotavirus es fecal-oral, aunque también se han especulado otras vías de contagio, como el contacto persona-persona, el contacto con secreciones respiratorias, y/o el contacto con superficies contaminadas, ya que la frecuencia de infección por estos virus es independiente de las condiciones higiénicas y sanitarias. En general, la transmisión de la enfermedad es especie-específica ya que no existen indicios de que ocurra transmisión entre el hombre y otros animales; sin embargo estudios de hibridación ARN-ARN han mostrado que algunas cepas aisladas en humano son recombinaciones entre cepas de origen humano y cepas de origen animal, lo que sugiere que puede haber transmisión interespecies (44).

Varios modelos animales han sido utilizados para investigar la patogénesis e inmunidad de la enfermedad por rotavirus. Ratones y conejos han servido como modelos, sin embargo es difícil trabajar con estos animales, ya que después de algunas semanas de nacidos, tanto ratones como conejos son inmunes a la infección por rotavirus. Esfuerzos por erradicar la enfermedad por rotavirus, han llevado a la creación de algunas vacunas que desafortunadamente no previenen la infección de forma satisfactoria. El desarrollo de una vacuna resulta complicado, debido a los numerosos factores relacionados a la

epidemiología de las infecciones por rotavirus. Actualmente no existe una vacuna que proteja eficientemente de la infección por rotavirus; de aquí la importancia del conocimiento de la biología de estos virus y de los mecanismos inmunológicos del huésped, que eventualmente permitan el desarrollo de medidas de prevención efectivas (44).

Generalidades de los rotavirus.

Los rotavirus son reconocidos como el principal causante de gastroenteritis severa en niños menores de 3 años y en otras especies animales. Los rotavirus fueron descubiertos en 1973 por Ruth Bishop y colaboradores al encontrar la presencia de partículas virales en células del intestino delgado de niños que tenían diarrea severa, no bacteriana. Posteriormente se propuso el nombre de rotavirus (del latín rota = rueda) con base en su morfología (43).

Los rotavirus se clasifican como un género de la familia *Reoviridae*. La partícula infecciosa (virión) se compone de tres capas concéntricas de proteínas (VPs por "Viral Protein"), las capas son: nucleocápside, capa intermedia y capa externa, juntas forman una estructura icosaédrica de aproximadamente 65-75 nm de diámetro y carecen de envoltura lipídica (18, 28). Su genoma se constituye de 11 segmentos de RNA de doble cadena (RNA_{dc}). La replicación, empaquetamiento del genoma e inicio de la morfogénesis se lleva a cabo en el citoplasma celular, dentro de estructuras llamadas viroplasmos, que son acumulaciones de las proteínas VP1, VP2, VP3, VP6, y las proteínas no estructurales del virus (NSPs por "Non Structural Protein"), NSP2, NSP5 y NSP6, así como de RNA viral(18).

La nucleocápside está compuesta por 60 dímeros de la proteína VP2 (94 KDa), por pequeñas cantidades de VP1 (125 KDa) que funciona como RNA polimerasa dependiente de RNA, así como por la guanilil-transferasa VP3 (88 KDa). La nucleocápside está rodeada por la capa intermedia compuesta de 780 moléculas de la proteína VP6 (41 KDa) agrupadas en 260 trímeros (14, 24, 28). Las partículas que contienen VP6 se conocen como partículas de dos capas (DLPs) de simetría T=1, a las que se les asocia la actividad de transcriptasa, ya que son la fuente del RNAm viral en la célula (47, 48, 50). La capa externa está compuesta por 780 moléculas de la glicoproteína VP7 (38 KDa) y por 60 espículas formadas por dímeros de la hemaglutinina viral VP4 (88 KDa). Las partículas de tres capas (TLPs) constituyen un virión maduro cuya simetría es T=13 (28, 47).

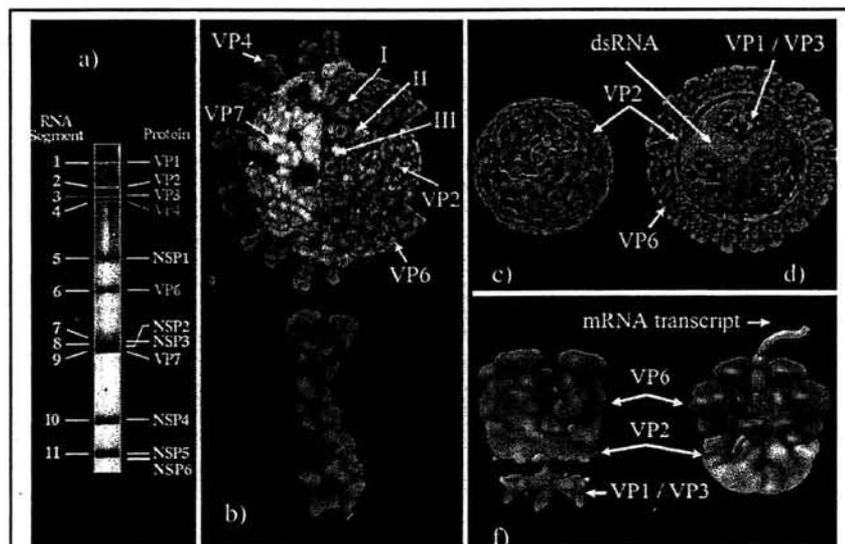


Figura 1. Representación esquemática de los Rotavirus. a) Se muestra el patrón electroforético de los once segmentos de RNAdc del genoma viral, así como las proteínas para las que codifican. b) Representación esquemática de la estructura tridimensional de un virión maduro (TLP) y de una espícula de VP4; además, se indican los tres tipos de canales presentes en la estructura de rotavirus (I, II, III). c) núcleo compuesto de las proteínas VP1, VP2 y VP3. d) Representación de un núcleo rodeado por VP6 (DLP), además, se indica la organización del RNAdc. e) Este esquema ilustra la hipótesis de que los RNAm salen de las TLPs por medio de canales.

Genoma viral

El genoma viral está constituido por 11 segmentos de RNAdc que se transcriben dentro de las DLPs. Los RNA mensajeros (RNAm) salen de esta estructura hacia el citoplasma celular por medio de poros formados por VP2 y localizados en los 5 ejes icosaédricos de la cápside (Fig. 1) (39). El marco de lectura abierto de cada gen es flanqueado por regiones 5' y 3' que no se traducen (UTRs) y que varían en longitud y secuencia entre cada segmento, aunque pequeñas secuencias consenso en los extremos 5' y 3' están conservadas. Los RNAm de rotavirus contienen la estructura 5' - CAP, pero carecen de la cola de Poli A en el extremo 3' (1, 2, 16, 39). Durante la replicación viral el RNAm tiene dos funciones: puede ser traducido a proteínas o puede ser transportado a viroplasmos y ser utilizado como templado para la síntesis del RNAdc (Fig. 4) (39, 49). Se han localizado 3 señales en los RNAm importantes para la síntesis de RNAdc, dos de ellas incrementan la síntesis y una es esencial para las síntesis de la cadena negativa. Se ha observado que las secuencias 5' UTR forman estructuras tallo asa, igualmente importantes (47, 48, 50).

Proteínas estructurales.

El segmento de RNAdc 1 (Gen 1) codifica para la proteína VP1 (125 KDa), que es considerada una RNA polimerasa dependiente de RNA por tener motivos de RNA polimerasa en su secuencia, por su afinidad a nucleótidos, por ser un componente de los complejos intermediarios de replicación (RIs) y por reconocer específicamente el 3' terminal de los RNAm; sin embargo, VP1 carece de actividad polimerasa en ausencia de VP2 (24, 48, 50).

El producto del gen 2, VP2 (94 KDa), es la proteína más abundante de la nucleocápside y constituye la capa más interna del virus (18). Cuando esta proteína se expresa por sí sola con el sistema de baculovirus, se ensambla en partículas similares a las nucleocápsides. VP2 tiene actividad inespecífica de unión a RNA e interactúa directamente con RNAdc. En experimentos de reconstitución utilizando proteínas purificadas, se ha encontrado que VP2 es esencial en la actividad de replicación. La distribución de esta proteína en células infectadas es asociada a viroplasmos (15, 27, 48, 50).

La proteína VP3 (88 KDa) es codificada por el segmento de RNAdc 3. A esta proteína se le ha atribuido la actividad de guanilil-transferasa del RNA viral ya que tiene afinidad por RNA de cadena sencilla, además su secuencia contiene motivos estructurales que se han encontrado en otras guanilil transferasas y une GTP de modo covalente en una reacción reversible, esta actividad es necesaria para la síntesis de RNAm maduros, por lo que VP3 debe de ser un componente esencial de los complejos de transcripción (43, 48, 50).

El segmento de RNAdc 4 codifica para VP4 (88 KDa), la cual forma espículas que se proyectan de la tercer capa del virión y tiene funciones esenciales en el ciclo replicativo del virus, incluyendo la unión al receptor y la penetración a la célula. El tratamiento de esta proteína con tripsina origina dos polipéptidos de menor peso molecular, llamados VP5 (60 KDa) y VP8 (28 KDa). Este corte se requiere para la entrada eficiente del virus a la célula, pero no es requerido para la unión del virus a la célula (13). La proteína VP4 no es necesaria para el ensamble de VP7 durante la morfogénesis, ya que en su ausencia se forman partículas de tres capas, pero sin espículas ("spikeless" TLPs); sin embargo, esta proteína es esencial para la infectividad del virus (18). Durante la infección VP4 se ha

observado en asociación a viroplasmos aunque también se han visto formas filamentosas, posiblemente por asociación con citoesqueleto (13, 27).

El gen 6 codifica para la proteína VP6 (41 KDa). Esta proteína interacciona con VP2 hacia el interior de la partícula y con VP4 y VP7 en la capa externa del virión (13). VP6 es esencial para la actividad de transcriptasa, pero no para la replicación (50). Durante una infección VP6 se observa en asociación a viroplasmos (27), aunque se han observado formas filamentosas de VP6 en células BHK transfectadas con un replicón que contiene el gen 6 de rotavirus (41), e *in vitro* se ha observado que VP6 puede formar estructuras tubulares (22, 42).

VP7 es codificada por el gen 7, 8, ó 9 dependiendo de la cepa de rotavirus que se analice. Junto con VP4 es responsable de los primeros contactos con la célula huésped. VP7 se modifica post-traduccionalmente por la adición de azúcares, es una N-glicoproteína que contiene únicamente oligosacáridos del tipo de alta manosa. Se sabe que VP7 es glicosilada cotraduccionalmente a medida que se inserta en el lumen del RE; la señal para esta inserción se encuentra contenida en el péptido señal presente en el extremo amino de VP7. La secuencia nucleotídica del gen para VP7 predice dos marcos abiertos. Ambos codones de inicio preceden regiones hidrofóbicas (llamadas H1 y H2), que tienen el potencial de funcionar como péptidos señal para dirigir la síntesis de VP7 al RE. La proteína VP7 es retenida en la membrana del RE; sin embargo, no contiene la secuencia típica de retención en RE (KDEL), aunque la retención se asocia con los aminoácidos ITG, en las posiciones 9-11 de VP7. La distribución de esta proteína durante la infección es en formas semicirculares que rodean a los viroplasmos y colocaliza con VP4 y NSP4 (44).

Proteínas no estructurales.

Las proteínas no estructurales de rotavirus, NSP1 a NSP6, son codificadas por los segmentos 5, 7, 8, 10 y 11, respectivamente. Estas proteínas no forman parte de la estructura del virión. Son sintetizadas en el citoplasma de la célula durante la infección y tienen funciones relacionadas con el control de la síntesis de proteínas celulares y virales, con la replicación del genoma, con el empaquetamiento de los genes virales y con la maduración de la partícula viral en el interior de la célula, aunque aún no se define completamente el papel de cada una de ellas en estas funciones (28).

Los genes 5 y 7 codifican para las proteínas no estructurales NSP1 (53 KDa) y NSP3 (34 KDa), respectivamente. Estas proteínas se distribuyen en el citoplasma e interactúan con componentes del citoesqueleto celular durante la infección (28, 47).

NSP3 se une a los mensajeros virales, reconociendo específicamente las cuatro últimas bases (...GACC3') las cuales forman parte de señales esenciales para la replicación del genoma y se encuentran en la región conservada del extremo 3' de los RNAm (39, 49, 50). Por otro lado, esta proteína interactúa específicamente con el factor celular eIF4GI que cumple un papel de iniciación de la traducción. En células eucariontes, este factor es responsable de la interacción de los ribosomas con el "CAP" de los RNAm e interactúa; a su vez con la proteína que une la región poli-(A) (PABP, poly-(A) binding protein) del extremo 3' de los RNAm celulares. Se ha demostrado que NSP3 puede desplazar selectivamente la unión de la PABP con el factor eIF4GI *in vitro* e *in vivo* y que esto favorece la unión del extremo 3' de los RNAm virales al factor eIF4GI, favoreciendo la

síntesis de las proteínas virales e interfiriendo con la traducción de los RNAm celulares. Además, se ha propuesto que NSP3 le confiere estabilidad al RNAm viral, y participa junto con NSP1 en el proceso de traslocación del RNAm hacia el viroplasma, primer paso necesario para la morfogénesis del virus (52).

La proteína NSP1 tiene un motivo tipo dedos de zinc, similar a los factores de transcripción eucarióticos TFIIA, el cual es requerido para su unión específica con los 11 RNAm (39, 47). Se ha pensado que la función de NSP1 puede ser bloquear la traducción de una fracción de los RNAm virales, conduciéndolos al viroplasma y secuestrándolos para servir como templados para la síntesis de RNAdc o que puede inhibir la respuesta antiviral; sin embargo, ensayos con rearglantes y utilizando el sistema de RNAi muestran que al parecer NSP1 no es esencial para la replicación de rotavirus en células MA104 (55).

Se ha observado que los complejos NSP1-RNAm-NSP3 se asocian con las proteínas estructurales VP1 y VP3. Dado que VP1 reconoce el extremo 3' (UGUGACC-3') del RNAm, región que se sobrepone con la reconocida por NSP3, y que VP3 reconoce el extremo 5', se ha sugerido que NSP1 y NSP3 son desplazadas competitivamente por VP1 y VP3, y que con este proceso quizá se concluye la traslocación de los RNAm al viroplasma, donde continua la morfogénesis de las partículas virales (44).

NSP2 (35 KDa) es codificada por el gen 8. En una infección se acumula en viroplasma, forma multímeros, se asocia con la polimerasa viral (VP1) y se autoensambla en octámeros (54, 60). Dichos octámeros tienen actividad de NTPasa dependiente de Mg^{+2} , actividad helicasa independiente de Mg^{+2} y actividad inespecífica de unión a RNA (28, 47).

Células infectadas con una cepa de rotavirus termosensible en el gen de NSP2 contienen pocos viroplasmos y producen partículas virales que carecen de RNAdc (53). Junto con el hecho de que NSP2 es un componente de los intermediarios de replicación, se ha propuesto que NSP2 puede funcionar como un motor molecular que se une a RNAm viral y cataliza su empaquetamiento a través de energía generada por su actividad NTPasa (56).

NSP4 es una glicoproteína no estructural (28 KDa) que tiene un dominio citoplásmico de retención en la membrana del retículo endoplásmico (38). Durante la morfogénesis viral, el dominio citoplásmico de NSP4 funciona como un receptor intracelular que une las nuevas partículas de doble capa y permite su gemación del viroplasma hacia el lumen del RE, donde luego maduran y salen de la célula ya con la capa proteica más externa. Recientemente se ha reportado que en células infectadas NSP4 sufre un corte proteolítico, lo cual origina un péptido que es secretado (64). Por otra parte se ha observado que NSP4 puede unirse a microtubulos y bloquear el tráfico de vesículas entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi (61).

El segmento 11 del genoma contiene dos marcos abiertos de lectura que codifican para dos proteínas: NSP5 y NSP6 (Fig. 2) (37, 40). NSP5 es una proteína de 197-200 aa, cuya secuencia primaria se caracteriza por un alto contenido de serina (20% aproximadamente) y treonina, además es una proteína O-glicosilada (25, 29, 47). Se ha sugerido que NSP5 tiene un peso de 21 a 22 KDa (47, 51); sin embargo, en geles de poliacrilamida se han observado diferentes moviidades electroforéticas que oscilan en un rango de 26, 28 y de 30 a 34 KDa, esto se atribuye a los diferentes grados de fosforilación que tiene la proteína

en residuos de serina de los cuales se han identificado 4 especialmente importantes para la fosforilación (2, 51). Éstos se localizan en el dominio C-Terminal de NSP5, dominio que además es importante en la formación de homoligómeros (21). El dominio C-terminal y el N-terminal son importantes para interactuar con NSP2, asociación que regula la hiperfosforilación de NSP5 y permite la formación de viroplasmos en células infectadas, o de estructuras parecidas a viroplasmos ("Viroplasm-like") en células transfectadas con NSP2 y NSP5 en ausencia de otras proteínas virales (1, 25, 40, 59).

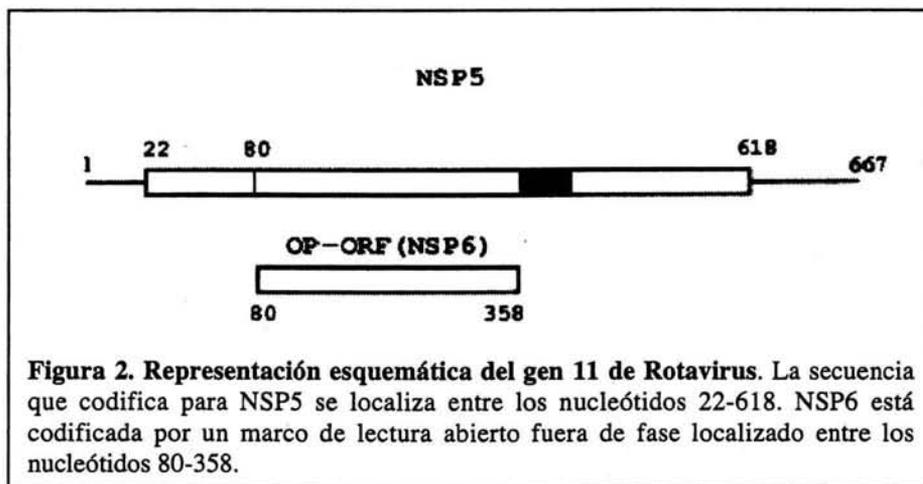


Figura 2. Representación esquemática del gen 11 de Rotavirus. La secuencia que codifica para NSP5 se localiza entre los nucleótidos 22-618. NSP6 está codificada por un marco de lectura abierto fuera de fase localizado entre los nucleótidos 80-358.

A NSP5 se le atribuye actividad autocinasa ya que al producirla en sistemas bacterianos se observan formas fosforiladas en geles de poliacrilamida, pero no formas hiperfosforiladas (6, 51). Sin embargo, no se descarta la participación de cinasas celulares, debido a que cuando la proteína es producida en células eucarióticas previamente tratadas con inhibidores de cinasas, la hiperfosforilación de NSP5 disminuye (7). Se ha propuesto que NSP5 puede ser el sustrato de cinasas y fosfatasas celulares que la fosforilan y defosforilan, y que la actividad de estas cinasas y fosfatasas puede ser regulada por la

misma NSP5 (21). Esta proteína cuenta, además, con actividad de unión a RNA de cadena sencilla y RNAdc independiente de secuencia (59). Se ha demostrado que NSP5 interactúa con NSP6 (por medio de su dominio C-Terminal), con NSP3, NSP2 y con la polimerasa viral VP1 (1, 28). Se ha demostrado que la distribución de NSP5 en células infectadas con rotavirus es principalmente asociada a viroplasmos, esto y su asociación con intermediarios de replicación sugieren un papel regulador para NSP5 (27, 51). Experimentos en donde se han utilizado virus reasemblantes sugieren que el grado de fosforilación de NSP5 puede contribuir a decidir el destino de los RNAm. Se ha propuesto que a bajos grados de fosforilación de NSP5 hay baja replicación y el RNAm está más disponible para traducción. Por otro lado, una alta fosforilación de NSP5 regulada por NSP2, podría dirigir el RNAm hasta el viroplasma donde se lleva a cabo la replicación (Figura 3) (30).

Por otro lado, se ha demostrado que NSP5 interactúa con VLPs, pero no con DLPs; además, se ha observado que la unión de NSP5 a VP2 afecta la estabilidad de unión de VP6 a VP2, por lo que NSP5 podría interactuar con los intermediarios de replicación para impedir la unión de VP6 evitando la formación de viriones incompletos, o bien NSP5 puede impedir la unión de VP6 evitando así el inicio de una transcripción prematura (5).

NSP6 (12 KDa), codificada del nucleótido 80 a 389 del gen 11, interactúa con NSP5 y se acumula en los viroplasmos (Fig. 2) (37, 40).

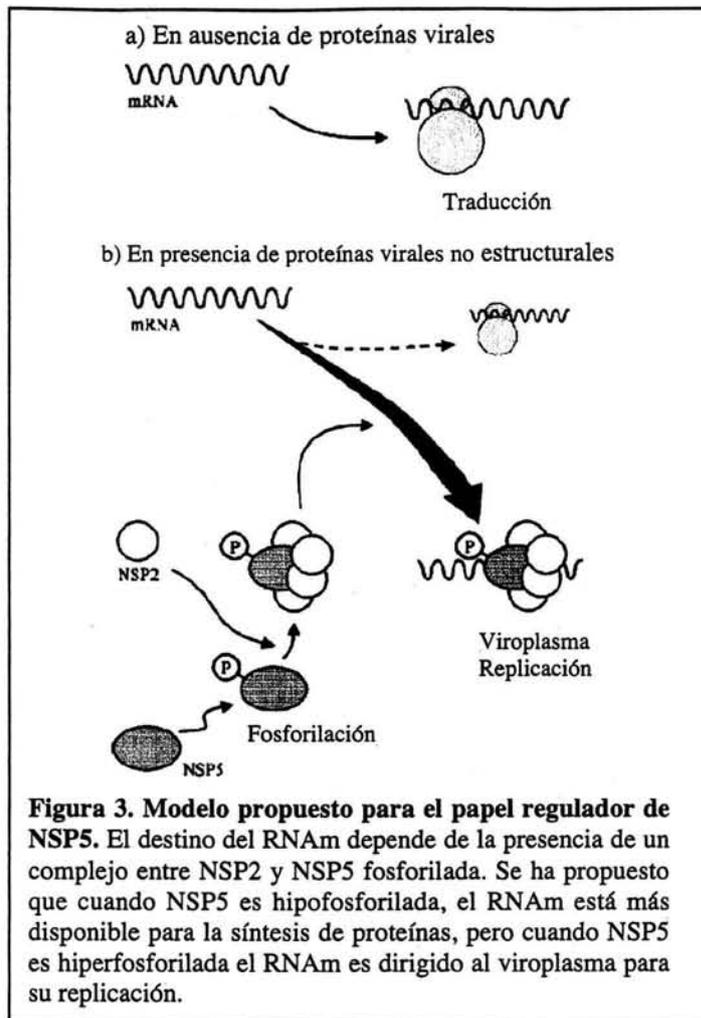


Figura 3. Modelo propuesto para el papel regulador de NSP5. El destino del RNAm depende de la presencia de un complejo entre NSP2 y NSP5 fosforilada. Se ha propuesto que cuando NSP5 es hipofosforilada, el RNAm está más disponible para la síntesis de proteínas, pero cuando NSP5 es hiperfosforilada el RNAm es dirigido al viroplasma para su replicación.

Ciclo Replicativo de Rotavirus.

Los rotavirus tienen tropismo por las microvellosidades intestinales; sin embargo, el conocimiento que se tiene de su ciclo de replicación se ha derivado de estudios realizados en células epiteliales de riñón de mono (MA104). La infección por rotavirus comienza con la unión de las partículas TLPs a receptores de la superficie celular. Una vez unidas

penetran en las células perdiendo la capa más externa formada por VP7 y VP4 lo cual activa la transcripción viral. Los transcritos salen a través de canales formados por VP2 y son utilizados para la síntesis de proteínas virales y RNAdc que formará el genoma de la progenie viral. Los RNAm pueden traducirse a su respectiva proteína en ribosomas libres en el citoplasma (para la mayoría de las proteínas) o asociadas al retículo endoplásmico para las proteínas NSP4 y VP7. (Figura 4).

En el interior de la célula las proteínas virales sintetizadas y el RNAm viral interactúan para formar intermediarios de replicación (RI), llamados así por contar con la actividad replicasa (RNA polimerasa dependiente de RNA). Los RIs llevan a cabo la síntesis del RNAdc tomando como molde los RNAm virales, la formación de los RIs y la síntesis de RNAdc genómico tienen lugar en los viroplasmos (59). Los intermediarios de replicación se forman a partir de un complejo inicial denominado precoreRI que carece de actividad de replicación e incluye a las proteínas VP1, VP3 y NSP3 (28). A partir de éste se ensambla otro complejo que ya incluye las proteínas del núcleo viral llamado coreRI, con actividad de replicación, el cual está constituido de VP1, VP2 y VP3 y puede tener asociadas las proteínas NSP2 y NSP5 (28, 59). La adición de VP6 da lugar al complejo llamado VP6RI que posee actividad de replicación y transcripción, esta partícula da lugar a las DLPs formadas con las proteínas VP1, VP2, VP3 y VP6 (28). Las DLPs maduran a TLPs gemando de los viroplasmos al RE adyacente, cuya membrana está modificada con las glicoproteínas virales NSP4 (que funciona como receptor de las DLPs) y VP7. Como resultado de la gemación, las partículas se envuelven en la membrana del RE (que incluye las proteínas virales) formando partículas intermediarias. Luego por un mecanismo desconocido las DLPs pierden la envoltura transitoria de lípidos junto con la proteína NSP4

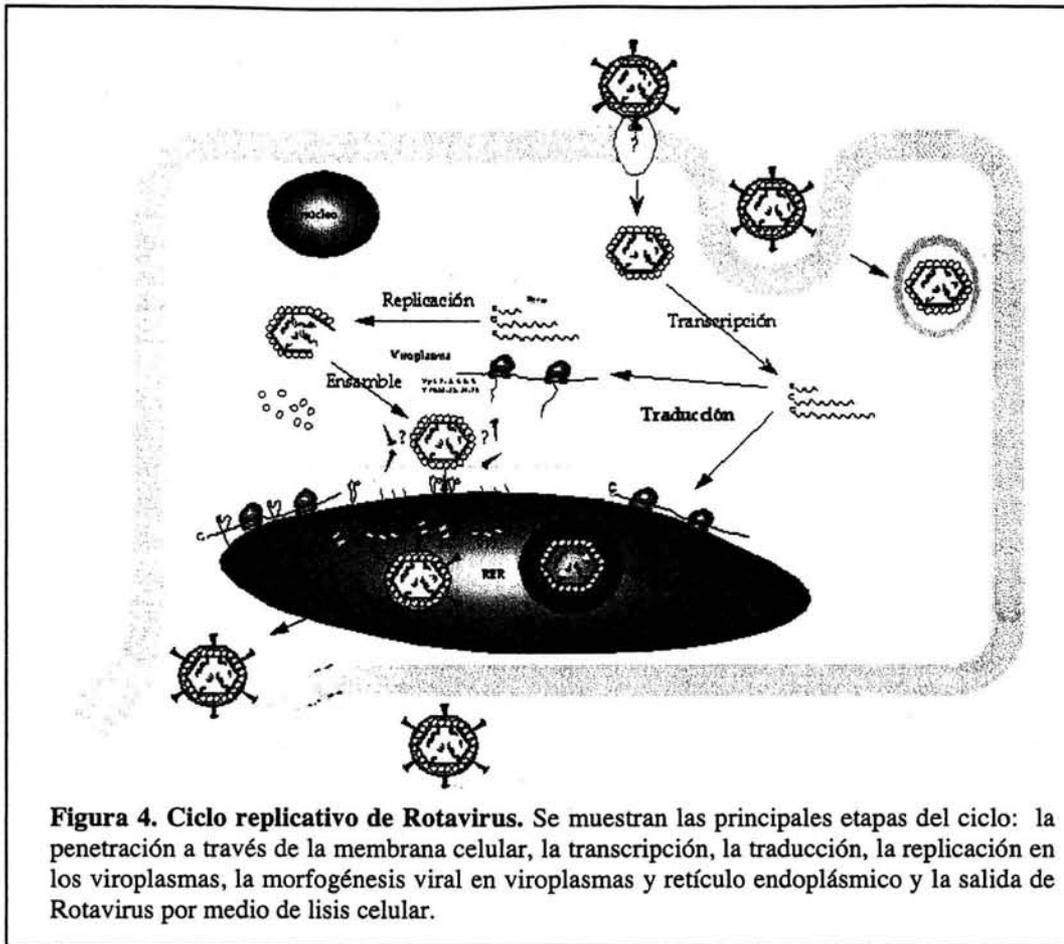


Figura 4. Ciclo replicativo de Rotavirus. Se muestran las principales etapas del ciclo: la penetración a través de la membrana celular, la transcripción, la traducción, la replicación en los viroplastos, la morfogénesis viral en viroplastos y retículo endoplásmico y la salida de Rotavirus por medio de lisis celular.

y selectivamente retienen a las proteínas VP4 y VP7 que se ensamblan formando la tercer capa proteica, dando lugar a los virus maduros compuestos de tres capas (TLPs). Finalmente los viriones se acumulan en el lumen del RE hasta ser liberados por la lisis celular (38, 54).

La interferencia por siRNAs

En los rotavirus actualmente no se dispone de un sistema de genética reversa que permita mutagenizar y evaluar la función de cada una de las proteínas virales y de sus dominios en el contexto de una infección. Una alternativa es el uso de un mecanismo propio de los organismos eucariontes, denominado "interferencia por RNA" o "RNAi". Este mecanismo se basa en el silenciamiento de genes a nivel postranscripcional y se activa por RNAdc dirigiendo la degradación del RNAm blanco, el cual es idéntico en secuencia al RNAdc que la activó (8, 10).

Esta tecnología tiene la ventaja de ser un mecanismo biológico conservado presente en plantas, insectos y mamíferos (3, 4). Al parecer el mecanismo de RNAi media la resistencia a los ácidos nucleicos parásitos tanto endógenos como exógenos y regula la expresión de genes que codifican para proteínas, particularmente durante el desarrollo y diferenciación de los tejidos de un organismo (8, 10).

El proceso de RNAi inducido por RNAdc se lleva a cabo en tres pasos: en el primero los RNAdc son procesados por una RNasa de tipo III llamada Dicer (4, 32). Esta enzima corta el RNAdc en muchas piezas de aproximadamente 21-23 pb con 2 nucleótidos sobresalientes en el extremo 3', llamados RNAs pequeños interferentes (siRNA) (4, 8, 10). En la segunda etapa se ha propuesto que los siRNAs se unen a un complejo enzimático identificado en *Drosophila* y llamado RISC (por sus siglas en inglés: RNA Induced Silencing Complex). En este complejo los siRNAs son convertidos a RNA de cadena sencilla por acción de una helicasa (3, 8). El tercer paso es el reconocimiento del RNA blanco de cadena sencilla, mediante la cadena negativa de los siRNAs que sirve como guía por

acoplamiento de bases. El RNAm blanco apareado con el siRNA puede seguir dos destinos: uno de amplificación de la señal interferente, en el cual el RNAm blanco es convertido a RNAdc mediante una RNAPol, que usa la cadena negativa del siRNA como iniciador para sintetizar la cadena complementaria. Este RNAdc es cortado nuevamente por Dicer para generar siRNAs secundarios; sin embargo, esta etapa no parece ocurrir en mamíferos. La otra opción que ocurre en células somáticas de insectos y vertebrados, es que el RNA blanco en el duplex siRNA-RNAm se degrade por acción de otras RNAasas del complejo RISC diferente a Dicer. De esta forma se evita la traducción a proteína (Figura 5) (3, 12, 19).

La respuesta por RNAi representa una herramienta potencial en el entendimiento de los mecanismos moleculares de cada etapa de la infección viral como son: la entrada, la transcripción, la replicación y la morfogénesis, lo cual puede ayudar al desarrollo de estrategias antivirales profilácticas y terapéuticas. Sin embargo, no se pueden introducir RNAdc directamente en las células de mamífero, ya que se desencadenan respuestas inespecíficas que dañan la traducción celular y eventualmente la célula llega a apoptosis. Se sabe que un RNAdc mayor de 30 pb desencadena tales respuestas y apoptosis por dos vías: en la primera, el RNAdc activa una proteína cinasa llamada PKR que a su vez fosforila e inactiva el factor de inicio de la traducción eIF2a, dando como resultado la represión total de la síntesis de proteínas. En la segunda vía, el RNAdc activa indirectamente a la ribonucleasa RNasa L, la cual degrada todos los RNAm celulares de manera inespecífica. Afortunadamente, se ha observado que el mecanismo de RNAi puede ser inducido por fragmentos de RNAdc de 21-26 pb denominados RNAs interferentes pequeños (siRNAs, por small interfering RNAs).

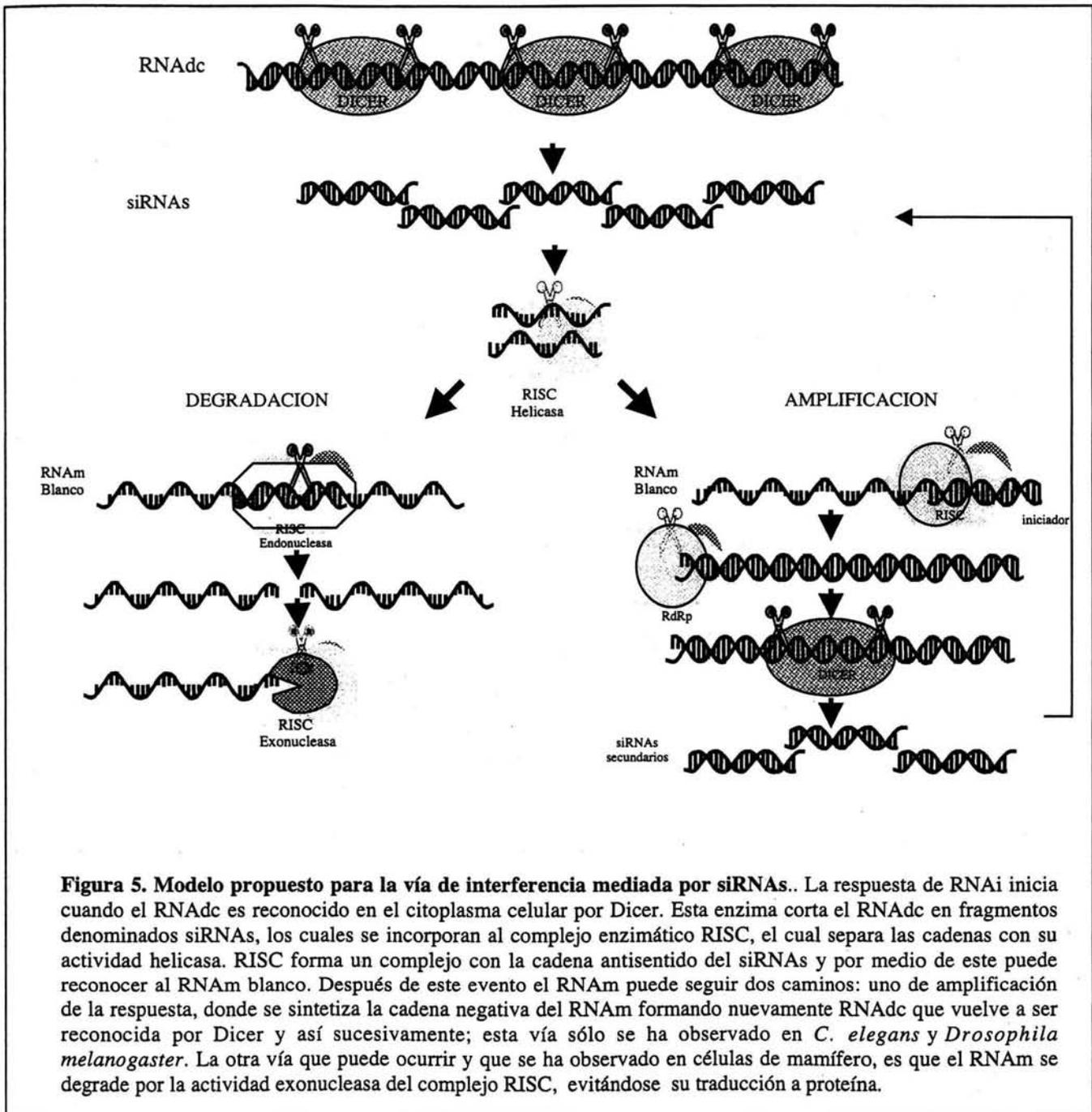


Figura 5. Modelo propuesto para la vía de interferencia mediada por siRNAs. La respuesta de RNAi inicia cuando el RNAdc es reconocido en el citoplasma celular por Dicer. Esta enzima corta el RNAdc en fragmentos denominados siRNAs, los cuales se incorporan al complejo enzimático RISC, el cual separa las cadenas con su actividad helicasa. RISC forma un complejo con la cadena antisentido del siRNAs y por medio de este puede reconocer al RNAm blanco. Después de este evento el RNAm puede seguir dos caminos: uno de amplificación de la respuesta, donde se sintetiza la cadena negativa del RNAm formando nuevamente RNAdc que vuelve a ser reconocida por Dicer y así sucesivamente; esta vía sólo se ha observado en *C. elegans* y *Drosophila melanogaster*. La otra vía que puede ocurrir y que se ha observado en células de mamífero, es que el RNAm se degrade por la actividad exonucleasa del complejo RISC, evitándose su traducción a proteína.

Los siRNAs pueden sintetizarse químicamente e introducirse en células de mamífero, evitando los efectos inespecíficos disparados por RNAdc. Se propone que el tamaño pequeño de los siRNAs evita la inducción de respuesta inespecífica. La forma de silenciar genes por medio de siRNAs parece ser un mecanismo común en varios organismos, por lo que se ha podido silenciar genes en plantas, hongos, protozoarios, nemátodos, insectos e incluso en células de mamífero (7, 12, 20, 23, 36).

Los siRNAs han sido introducidos en diferentes organismos por microinyección, por transfección, o por alimentación de organismos con *Escherichia coli* que expresan siRNAs y por liposomas catiónicos. Aunque también se pueden producir dentro de la célula usando siRNAs procesados a partir de un precursor de RNAs expresado en el núcleo celular (5, 12, 62). Estos métodos han sido utilizados para el silenciamiento de genes propios del organismo y recientemente se han realizado experimentos donde se reporta que secuencias específicas de siRNAs, administradas en células MA104, han permitido silenciar el gen que codifica para la proteína VP4 de rotavirus, lo cual permitió conocer más acerca de su función (18). También se ha reportado el uso de siRNAs en el estudio de VIH-1 y poliovirus (12). Estos resultados sugieren que los siRNAs pueden ser usados como una herramienta genética, para analizar la función de un gen mediante la inhibición de su expresión a nivel de traducción y observar el resultado de esta manipulación.

Justificación

La infección por rotavirus representa un gran problema de salud pública, ya que es la causa principal en el mundo de gastroenteritis en niños menores de tres años, sobre todo en países en vías de desarrollo donde se presentan elevadas tasas de mortalidad. Por lo que se requiere ampliar el estudio sobre ellos; sin embargo, en los rotavirus no se dispone de un sistema de genética reversa que permita mutagenizar y evaluar la función de cada una de las proteínas virales. Una alternativa es el uso de un mecanismo propio de los organismos eucariontes, denominado "interferencia por RNA" o "RNAi". Este sistema puede proveer información acerca de los mecanismos moleculares de cada etapa de la infección viral como son: la entrada, la transcripción, la replicación y la morfogénesis, lo cual puede ayudar al desarrollo de estrategias antivirales. Por otro lado, el estudio de los virus también puede ayudar a comprender mejor el funcionamiento de procesos celulares relacionados con el flujo de la expresión genética, ya que los virus explotan eficientemente estos sistemas.

Objetivo:

- Inhibir la expresión del gen 11 que codifica para la proteína NSP5 de la cepa RRV de rotavirus en la línea celular MA104 derivada de riñón de mono.

Objetivos particulares.

- Analizar el efecto que tiene la inhibición de la expresión del gen 11 en la producción de la progenie viral.
- Analizar la expresión de NSP5 en células infectadas.
- Analizar el efecto que tiene la inhibición de la expresión del gen 11 sobre la síntesis y distribución de proteínas virales en el citoplasma celular.

Hipótesis

Dado que NSP5, codificada por el gen 11 de rotavirus, ha sido implicada en la regulación de la síntesis de proteínas y RNAdc, así como en la formación de viroplasma, la inhibición de la expresión del gen 11 modificará la síntesis de proteínas y del genoma viral, así como la distribución de las proteínas asociadas a viroplasma.

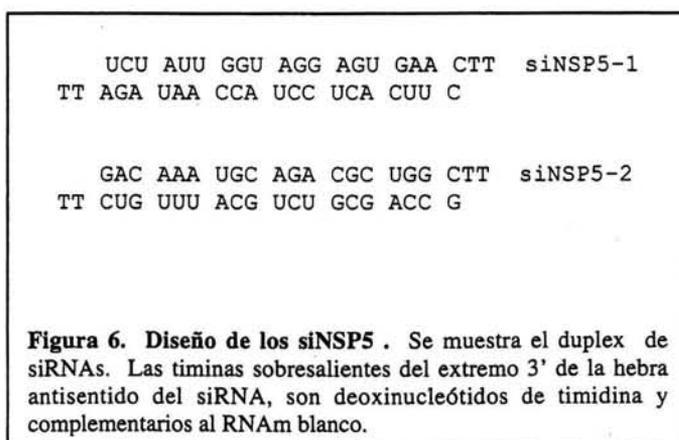
Materiales y Métodos.

Células y Virus.

La línea celular empleada en todos los experimentos de este trabajo fue MA104 derivada de células epiteliales de riñón del mono *Rhesus*, crecidas en medio mínimo esencial de Eagle suplementado con 10% de suero fetal bovino. La cepa de rotavirus del mono *Rhesus* RRV, fue suministrada por H.B. Greenberg, Universidad de Stanford, Palo Alto CA, la cepa RF fue suministrada por J. Cohen, laboratorio de virología e inmunología molecular, Francia y la cepa Wa fue aislada en nuestro laboratorio.

siRNAs.

Los siRNAs (Fig. 6), se diseñaron de acuerdo con las recomendaciones de la compañía Dharmacon Research Inc (Lafayette, Co., EUA) y del grupo de Thomas Tuschl.



La síntesis de los siRNAs se ordenó a la compañía Dharmacon Research Inc (Lafayette, Co., EUA) a la escala de 0.2 mM, purificados y apareados (duplex), listos para la transfección. Se reciben liofilizados en amortiguador de hibridación y se reconstituyen con agua libre de RNAsas.

Lipofección de los siRNAs.

La lipofección se realizó en monocapas de células MA104 confluentes, ésto fue importante, pues impide que la mezcla de lipofección sea más agresiva con las células.

Los siRNAs se prepararon como sigue:

1. En un tubo de poliestireno se colocaron 4 μ l de lipofectamina y 21 μ l de medio mínimo esencial (MEM) sin suero (s/s), mezclando con pipeta.
2. En un tubo de poliestireno se mezclaron 6 μ l del siRNA con una concentración de 20 mM con 19 μ l de MEM s/s.
3. Los siRNAs del paso 2 se mezclaron con la lipofectamina del paso 1. La mezcla obtenida se incubó 30 minutos a temperatura ambiente.
4. Después de la incubación se agregaron 150 μ l de MEM s/s mezclando suavemente. De esta mezcla se escalaron los volúmenes según el formato de cultivo para usar: 50 μ l para el formato de placa de cultivo C-96, 350 μ l para un pozo C-12 con cubreobjetos, 600 μ l para un pozo C-6 y 3 ml para un frasco F75.

5. La mezcla se dejó actuar sobre las células MA104 (previamente lavadas dos veces con MEM s/s) por 8 h al cabo de las cuales las células se lavaron dos veces con MEM s/s y se dejaron incubando en MEM s/s por 48 h.

Determinación del rendimiento viral.

Para determinar el efecto sobre la progenie viral, debido a la presencia de los siNSP5, se produjeron lisados a partir de monocapas de células MA104, previamente lipofectadas con los siRNAs como se describió antes. Las células se infectaron con una multiplicidad de infección (moi) (# de partículas virales por célula) de 3, 12 hrs p.i., las células se cosecharon por congelación, este tiempo corresponde aproximadamente a un ciclo de replicación de rotavirus, ésto constituyó el lisado que se tituló de la siguiente forma:

1. Los lisados se congelaron una vez más a -20° C y después de descongelarlos se activaron con tripsina (20 mg/ml) durante 20 minutos.
2. Se hicieron diluciones seriadas de cada lisado y con ellos se infectaron monocapas de células MA104 en placas de 96 pozos por 1 h a 37° C. Los pozos se lavaron 2 veces con 100 μ l de MEM s/s y se dejaron 14-16 h a 37° C en incubadora con 5% de CO_2 .
3. Se retiró el medio de cultivo a las células y se fijaron con 100 μ l de acetona al 80% durante 15 minutos, transcurrido este tiempo las monocapas celulares se lavaron dos veces con 200 μ l de PBS 1X.

4. Las células fijadas se incubaron con el suero policlonal anti-YM (C75) generado en el laboratorio en una dilución de 1:750 (v/v) en PBS 1X por una hora a 37° C.
5. Después se lavaron las células dos veces con 100 µl de PBS 1X, y se dejaron incubando 1 h con proteína A-peroxidasa (Amersham-Pharmacia Biotech) en una dilución de 1:3000 (v/v) en PBS 1X.
6. Para revelar las células infectadas se usó 3-amino-9-etil-carbazole (SIGMA CHEMICALS) como sustrato para la peroxidasa, lo cual produce un precipitado en color café.
7. La determinación del título viral se llevó a cabo contando las células teñidas (focos infecciosos) en cada dilución.
8. La fórmula para determinar el título viral a partir de los focos contados con el objetivo de 10X contando 9 campos fue:
No. De Focos X dilución X 4.5 X 20 (Factor de volumen de 50 µ) = unidades formadoras de focos infecciosos por mililitro (uff/ml)

Western Blot.

1. Células MA104 previamente transfectadas con siRNAs se infectaron con RRV por 1 h, después de este tiempo las células se lavaron con MEM s/s y se dejaron incubando por 12 h.
2. Al cabo del tiempo de incubación, se retiró el MEM de las monocapas y se lisó con 100 µl de amortiguador de carga 1X (50 mM Tris-Cl pH 6.8, 2% SDS, 0.1% azul de bromofenol, 10% glicerol, 1% β-mercaptoetanol) para el formato C-96.

3. Los lisados se hirvieron por 5 minutos.
4. Se tomaron 10 μ l de lisado para electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida 14%.
5. Las proteínas se transfirieron a una membrana inmobilon-NC (Millipore), durante 1 h a 130 mA, en amortiguador CAPS 1X (10 mM) empleando el módulo de transferencia Mini Trans-Blot, dentro del sistema MiniPROTEAN 3.
6. La membrana se bloqueo con 5% de leche descremada (Carnation) en PBS 1X-0.1% tween 20, durante 1 h en agitación.
7. La membrana se incubó con los anticuerpos primarios diluidos en PBS-0.1% tween 20. Para detectar NSP5 se utilizó un suero policlonal en dilución 1:1000 (v/v), además se usaron los sueros anti-TLPs o anti-YM para detectar proteínas estructurales del virus y el anticuerpo anti-vimentina. Estos anticuerpos se utilizaron en una dilución 1:1000 (v/v), la incubación fue por toda la noche a 4° C o 1 h a temperatura ambiente. Al finalizar la incubación se hicieron 3 lavados con PSB 1X-0.1% tween 20 por 10 minutos y 3 tres lavados de 10 minutos con PBS 1X.
8. El segundo anticuerpo usado fue anti-conejo conjugado A-peroxidasa (NEN) diluido 1:10,000 (v/v) en PBS 1X-0.1% tween 20. Al finalizar la incubación se hicieron 3 lavados con PSB 1X-0.1% tween 20 por 10 minutos y 3 tres lavados de 10 minutos con PBS 1X.
9. La detección de las proteínas se realizó con el sustrato para peroxidasa western ligthning, según las instrucciones del proveedor (Perkin-Elmer) exponiendo la película hipersensible X-Omat (Kodak) a diferentes tiempos para no saturar las señales.

Extracción de RNA viral.

1. Para este ensayo se utilizaron 200 μ l de un lisado de células, lipofectadas con siRNAs y e infectadas con RRV, estos se mezclaron con 40 μ l del amortiguador disruptor 5X (Tris Base 2.6 M, EDTA 750 mM, SDS 450 mM, NaCl 6.8 M, β -mercaptoetanol 1.8 M).
2. Se agregaron 200 μ l de fenol saturado y se agitó con un vortex durante 2 minutos.
3. Se adicionaron 200 μ l de cloroformo, y se agitó con un vortex durante 2 minutos, esta mezcla se centrifugó durante 5 minutos a 12,000 rpm.
4. Se recuperó el sobrenadante y se agregaron 2.5 volúmenes de etanol absoluto y 50 μ l de acetato de sodio, esto se dejó precipitar toda la noche.
5. Después de precipitar, se agitó con un vortex y se centrifugó 15 minutos a 12,000 rpm, se decantó el sobrenadante y el pelet fue resuspendido en 30 μ l del amortiguador de carga (Tris-Cl 50 mM pH 6.8, Azul de bromofenol 0.1%, glicerol 10%).
6. Las muestras se analizaron en geles de acrilamida sin SDS, la electroforesis se realizó durante 4 h a 150 V.
7. Terminada la electroforesis, el gel se colocó 1 h en una solución fijadora (28.7% etanol, 0.3% ácido acético). Después el gel se colocó 30 minutos en una solución de nitrato de plata 11 mM.
8. Después de enjuagar dos veces el gel con agua destilada, se agregó la solución reveladora (NaOH 700 mM, 0.8 % formaldehído).

9. Al aparecer el patrón de bandas de RNAdc se retiró la solución reveladora y se detuvo la reacción con ácido acético al 10%.

Inmunofluorescencia.

Para este análisis, las células MA104 se crecieron sobre un cubreobjetos en cajas C-48, una vez que las células alcanzaron la confluencia necesaria, se lipofectaron con los siRNAs por 8 h y 48 h postlipofección (p.l.f) las células fueron infectadas con RRV a una multiplicidad de infección (moi) de 3, al cabo de 8 h postinfección (p.i) se procedió la inmunofluorescencia como sigue:

1. La monocapa celular se lavó una vez con PBS 1X y se fijó durante 20 minutos con 300 μ l de una solución 2% de para-formaldehído (SIGMA CHEMICALS) en PSB 1X. Al finalizar la incubación se hicieron 4 lavados de 5 minutos cada uno con 300 μ l de PBS 1X-NH₄Cl 50 mM.
2. Las células MA104 fijadas se permeabilizaron durante 15 minutos con 200 μ l del amortiguador de permeabilización (PBS 1X, 1% BSA, 0.5% tritón X-100, NH₄Cl 50 mM).
3. Las células se incubaron con el o los anticuerpos primarios por una hora a temperatura ambiente en 100 μ l de amortiguador (PBS 1X, 1% BSA, NH₄Cl 50 mM). Para detectar la proteína NSP5 se utilizó el suero policlonal α NSP5 en dilución 1:400 (v/v), además, se usaron los anticuerpos monoclonales HS2 (donado por H.B Greenberg) en dilución 1:200 (v/v) para detectar la proteína

VP4, los anticuerpos monoclonales 3A8 para VP2 en dilución 1:200 (v/v), 255/6 para VP6 en dilución 1:200 (v/v), 60 para VP7 en dilución 1:200 (v/v) y B4 para NSP4 en dilución 1:200 (v/v), además, se usó un suero policlonal α NSP2 en dilución 1:200 (v/v); al finalizar la incubación se hicieron 4 lavados de 5 minutos cada uno con 500 μ l de PBS 1X-NH₄Cl 5 mM.

4. Como anticuerpos secundarios se utilizó anti-conejo acoplado a Alexa 488 y anti-ratón acoplado a Alexa 568 (Molecular Probes). Al finalizar la incubación se hicieron 4 lavados de 5 minutos cada uno con 500 μ l de PBS 1X-NH₄C 5 mM.
5. El cubre objetos con las células hacia abajo se montó sobre un porta objetos con 3 μ l de glicerol 70%, fijando sus bordes con barniz de uñas.
6. Las preparaciones se visualizaron en un microscopio confocal MRC-600 (Bio-Rad) con ayuda del programa CoMOS MPL-1000; se utilizaron las líneas de excitación amarilla (λ 568 nm) y azul (λ 488 nm) y los filtros K1 o K2.

Gradientes

1. Se lipofectaron frascos de cultivo F75 con células MA104 con 3 ml de la mezcla del siNSP5-1 o siLamA/C.
2. 48 h.p.i las células MA104 se infectaron por 1 h a una moi de 3, después las células se lavaron 2 veces con 5 ml MEM s/s y se dejaron incubando en 5 ml de MEM, hasta llegar a efecto citopático total (24-26 h.p.i.).
3. El cultivo se lisó congelando y descongelando dos veces a -20° C.
4. El lisado fue ultracentrifugado a 30,000 rpm durante 1 h.

5. La pastilla generada se resuspendió en 750 μ l del amortiguador TNC (Tris pH 7.5 10 mM, NaCl 140 mM, CaCl 10 mM) y se mezcló con un vortex.
6. Se adicionó 750 μ l de Freón (cloro, difluoro metano) y se mezcló con un vortex, después se centrifugó a 6,000 rpm durante 5 minutos, se recuperó la fase acuosa (virus). Se adicionó nuevamente 750 μ l de TNC a la fase orgánica y se repitió la extracción tres veces más.
7. Al total extraído se adicionó 2.2 g de CsCl y se aforó a 5 ml con TNC, esta mezcla se ultracentrifugó a 36, 000 rpm durante 18 hrs.
8. Las bandas opalescentes se visualizaron bajo la luz de una lámpara y se tomaron fotografías con una cámara digital.
9. Las partículas en el gradiente se recolectaron picando cada una de las bandas con ayuda de una jeringa de 1 ml.

Análisis de proteínas a partir de gradientes de CsCl

1. Se tomaron 50 μ l de cada banda y se mezclaron con 50 μ l de cloroformo.
2. Se adicionó 150 μ l de agua destilada y se mezcló con ayuda de un vortex.
3. La mezcla se centrifugó 2 minutos a 13,000 rpm.
4. Se retiró la parte superior y a la fase inferior se añadieron 200 μ l de metanol.
5. Esta mezcla se centrifugó dos minutos a 13,000 rpm, después de esto se decantó el sobrenadante.

6. El pelet se resuspendió en 50 μ l de amortiguador de carga 1X (50 mM Tris-Cl pH 6.8, 2% SDS, 0.1% azul de bromofenol, 10% glicerol, 1% β -mercaptoetanol), y se hirvieron durante 5 minutos.
7. Las muestras se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 11%.
8. El gel se fijó 1 h en metanol al 50% y ácido acético al 12%.
9. Después se lavó tres veces con etanol al 30% por espacios de 20 minutos.
10. El gel se colocó en una solución de tiosulfato de sodio (0.2 g/L) durante 1 minuto.
11. Pasado este tiempo, el gel se incubó por 20 minutos en nitrato de plata (6 g/L) y 74 μ l de formaldehído al 37%.
12. El gel se lavó dos veces con agua destilada y se agregó la solución reveladora (Carbonato de sodio 560 mM, 50 μ l de formaldehído 37% /L, y 600 μ l de tiosulfato de sodio (del paso 10)).
13. Una vez que se hizo visible el patrón de bandas, el gel se lavó dos veces con agua, y la reacción de revelado se detuvo con metanol al 50% y ácido acético al 12%.

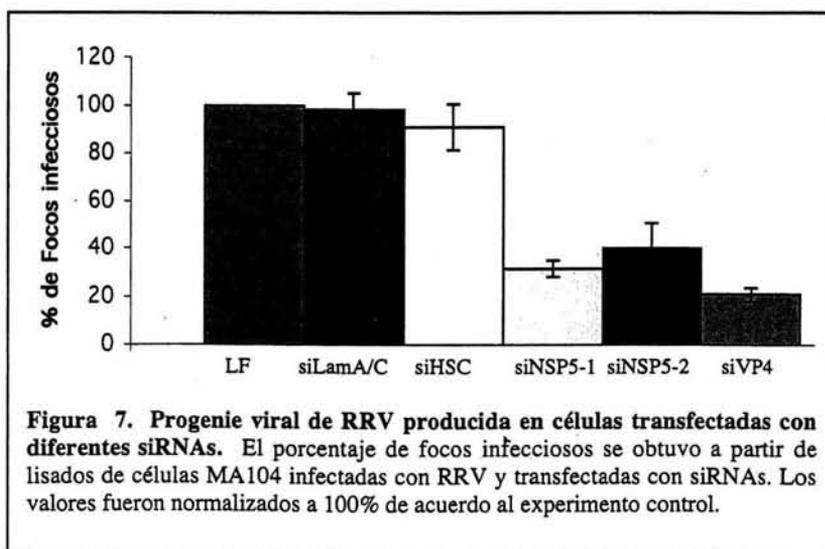
Análisis de RNAdc a partir de gradientes de CsCl.

1. Las alícuotas de cada fracción o banda se desalaron con la resina sephadex G-25 coarse (Sigma chemicals) estéril lavadas con PBS 1X y se empacaron en una jeringa de 1 ml. La resina se seco y se le pasaron 20 μ l de PBS, ambas mediante una centrifugación de 20 segundos a 1000 rpm. Entonces se colocaron 20 μ l de las fracciones en la columna y se centrifugó de la misma manera para obtener una solución de virus libre de CsCl.
2. Las alícuotas obtenidas después de la desalación, se analizaron utilizando el protocolo para la obtención de RNAdc.

RESULTADOS

EL siNSP5-1 inhibe la producción de progenie viral

Con el objetivo de analizar el efecto que tiene la ausencia de la proteína NSP5 sobre la progenie viral de rotavirus, se diseñó un par de siRNAs, dirigido contra el gen 11 de la cepa de rotavirus RRV, que codifica para las proteínas NSP5 y NSP6. El efecto que tuvo el interferente fue analizado primero por rendimiento viral, mediante la lipofección de células MA104 con las secuencias correspondientes a los genes NSP5 (siNSP5-1 y siNSP5-2) y al gen VP4 (siVP4) de rotavirus. Además se usaron los siLamA/C y siHSC como controles. El siVP4 se usó como un control positivo, ya que se ha demostrado que causa una reducción considerable de la progenie viral, así como de la síntesis de la proteína VP4 (18). El número de focos infecciosos producidos en células tratadas con el siNSP5-1 y el siNSP5-2 es aproximadamente 70 y 60% menor al que se produce en las células control, respectivamente (Fig. 7). Por su parte el interferente de VP4 muestra una disminución del



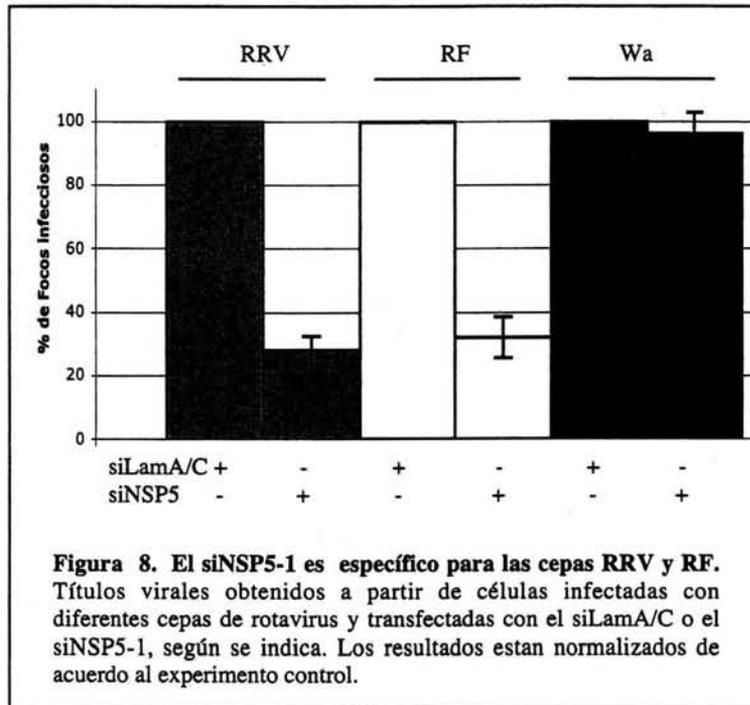
80% con respecto al control, de acuerdo a lo reportado por Déctor et al (18) (Fig. 7). Con base en estos resultados en los experimentos posteriores se decidió reportar únicamente aquellos obtenidos con el siNSP5-1.

Para descartar un efecto inespecífico, se probó el efecto del interferente sobre la producción de progenie viral de las de las cepas RF (rotavirus bovino) y Wa (rotavirus de humano). RF fue utilizado como un control positivo, ya que tiene la misma secuencia nucleotídica en la región homóloga al siNSP5-1 (Tabla 1). Wa fue utilizado como un control negativo ya que presenta dos nucleótidos diferentes en la región homóloga al siNSP5-1 (Tabla 1). Estos controles fueron utilizados ya que se sabe que la respuesta por RNAi es altamente específica y basta que un nucleótido en el RNAm sea diferente al siRNA para que no haya reconocimiento y por lo tanto, el mensajero no sea degradado por RISC.

| | Secuencia |
|----------------------|--|
| siNSP5-1 (Duplex) | UCUAUUGGUAGGAGUGAAC . dTdT dTdT . AGAUAACCAUCCUCACUUG |
| RRV | 5' AATCTATTGGTAGGAGTGAAC 3' |
| RF | 5' ----- 3' |
| Wa | 5' -----AC-- 3' |

Tabla 1. Comparación de la región siNSP5-1 en cepas de rotavirus.

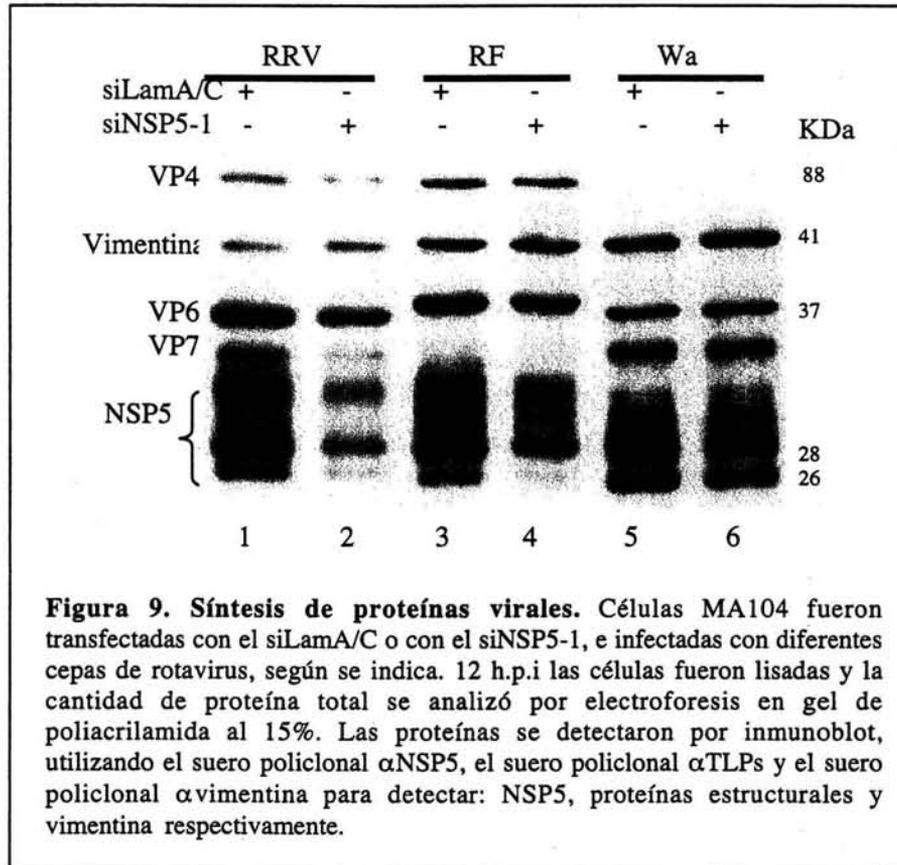
Como se esperaba, los títulos virales de RRV y RF obtenidos para las células tratadas con el siNSP5-1 fueron similares. En ambos casos hay reducción de la progenie viral; sin embargo, el título viral de la cepa Wa es similar a los que se encontraron en las células lipofectadas con el siLamA/C (Fig. 8).



El siNSP5-1 inhibe la síntesis de la proteína viral NSP5.

Para verificar que el siNSP5-1 reduce la expresión de la proteína NSP5 se realizaron ensayos de western-blot, lo cual brinda una forma de estimar la cantidad relativa de proteína viral expresada en las células infectadas en presencia y ausencia de los interferentes. El análisis de las bandas indicó que en células MA104 transfectadas con el siNSP5-1 la expresión de NSP5 se reduce considerablemente en comparación a las células

control; además, se observa que las proteínas estructurales VP2, VP4, VP6 y VP7 también disminuyen (Fig. 9, carriles 1 y 2). Como control de carga utilizamos la proteína vimentina, la cual permanece en cantidades similares en células transfectadas con el siNSP5-1 o con el siLamA/C. Desafortunadamente no se logró detectar la proteína NSP6.



Los resultados obtenidos muestran que la síntesis de NSP5 y proteínas estructurales de la cepa RF disminuyen cuando las células son tratadas con el siNSP5 (Fig. 9 carril 4), a diferencia de la cepa Wa, en la cual la síntesis de proteínas es muy parecida a los controles (Fig. 9 carril 6). Con estos resultados se muestra que el siNSP5-1 tiene especificidad por el RNAm del gen 11 de RRV y RF afectando la síntesis de NSP5, pero no

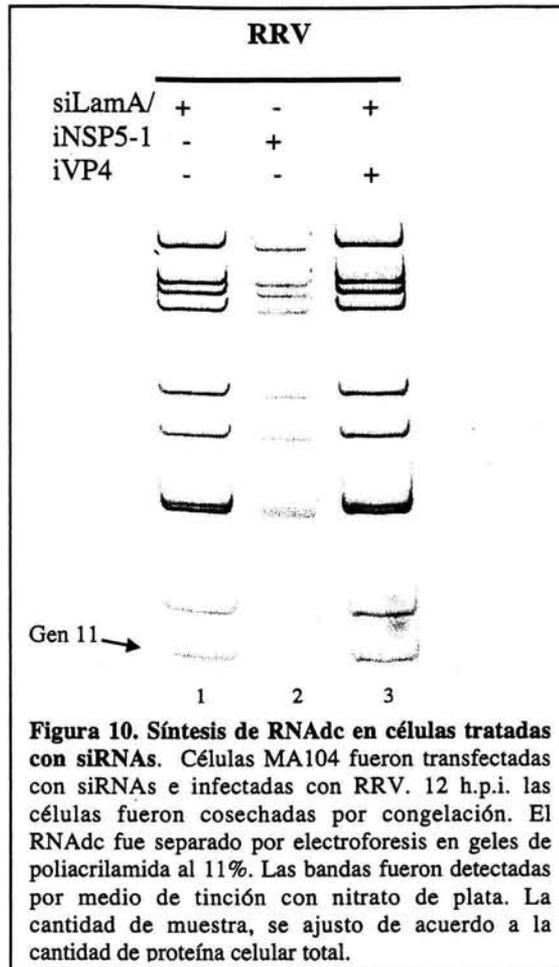
afecta la síntesis de NSP5 de la cepa Wa (Fig. 9). En conjunto estos datos demuestran que la reducción de otras proteínas virales no se debe a un efecto generalizado sobre los RNAm de rotavirus, o a la inhibición de la traducción general de las proteínas celulares, sino que es consecuencia de la reducción en la síntesis de la proteína NSP5.

Síntesis de RNAdc en células tratadas con siNSP5-1

El análisis de RNAdc en células infectadas con RRV y transfectadas con siRNAs muestra que la síntesis de éste disminuye considerablemente para los 11 genes de rotavirus en células tratadas con el siNSP5-1, a diferencia de las células tratadas con el siLamA/C, o con el siVP4 donde no se observa reducción en la síntesis del genoma (Fig. 10). Lo anterior apoya la idea de que este efecto está dado por la reducción en la síntesis de la proteína NSP5. En este experimento, el gen 11 se ve disminuido; sin embargo, como se esperaría esta reducción no es mayor a la que se observa con otros genes. Esto coincide con la hipótesis de que existe una fracción de RNAm que se utiliza para la replicación y que esta fracción es protegida de la degradación por RNAi (18).

La inhibición de NSP5 produce reducción en el número y tamaño de viroplasmos y cambios en la distribución de otras proteínas virales.

Se ha propuesto que NSP5 junto con NSP2 forman una especie de andamio donde las demás proteínas virales se pueden anclar y formar los viroplasmos, sitio donde se lleva a



cabo la replicación del RNAdc e inicio de la morfogénesis de rotavirus. Por lo que se decidió analizar el efecto que tiene el siNSP5-1 sobre la formación de viroplasmos y la distribución en citoplasma de las proteínas asociadas a ellos. En células transfectadas con siLamA/C, NSP5 y las proteínas estructurales se detectaron en cantidades normales y con una distribución en citoplasma similar a la que se ha reportado (27). La Fig. 11 muestra que las proteínas VP2, VP6, NSP2 y NSP5 tienen una distribución muy similar asociadas a viroplasmos; que VP7 y NSP4 (proteínas que se sintetizan en asociación al RE) se encuentran en regiones perinucleares del RE formando pequeñas estructuras en forma

de media luna que rodean a los viroplasmias; que VP4 aunque no es una proteína sintetizada en asociación con RE, tiene una localización similar a VP7 y NSP4. En las células transfectadas con el siNSP5-1 se observa reducción en el número y tamaño de viroplasmias por célula, así como de la cantidad de VP2, VP7, NSP2 y NSP5, pero, su distribución en citoplasma, es similar a la que se observa en los controles (Fig. 11). Sin embargo, las proteínas VP4, VP6 y NSP4 se observan en formas filamentosas distribuidas en el citoplasma celular (Fig. 11). Para saber si estas fibras colocalizan entre sí, se realizaron experimentos de cotinción de estas proteínas en células transfectadas con el siNSP5-1. Los resultados encontrados muestran que las fibras formadas por VP4, VP6 y NSP4 en células interferidas para el gen 11 sí colocalizan (Fig. 12). Las formas filamentosas observadas, sugieren que probablemente VP4, VP6 y NSP4 pueden estarse asociando con algunos componentes del citoesqueleto, por lo que se realizaron experimentos de cotinción de estas proteínas con actina, tubulina y vimentina. Sin embargo, los resultados obtenidos muestran que estas fibras no colocalizan con el patrón de fibras de vimentina, tubulina ni actina (Fig. 12).

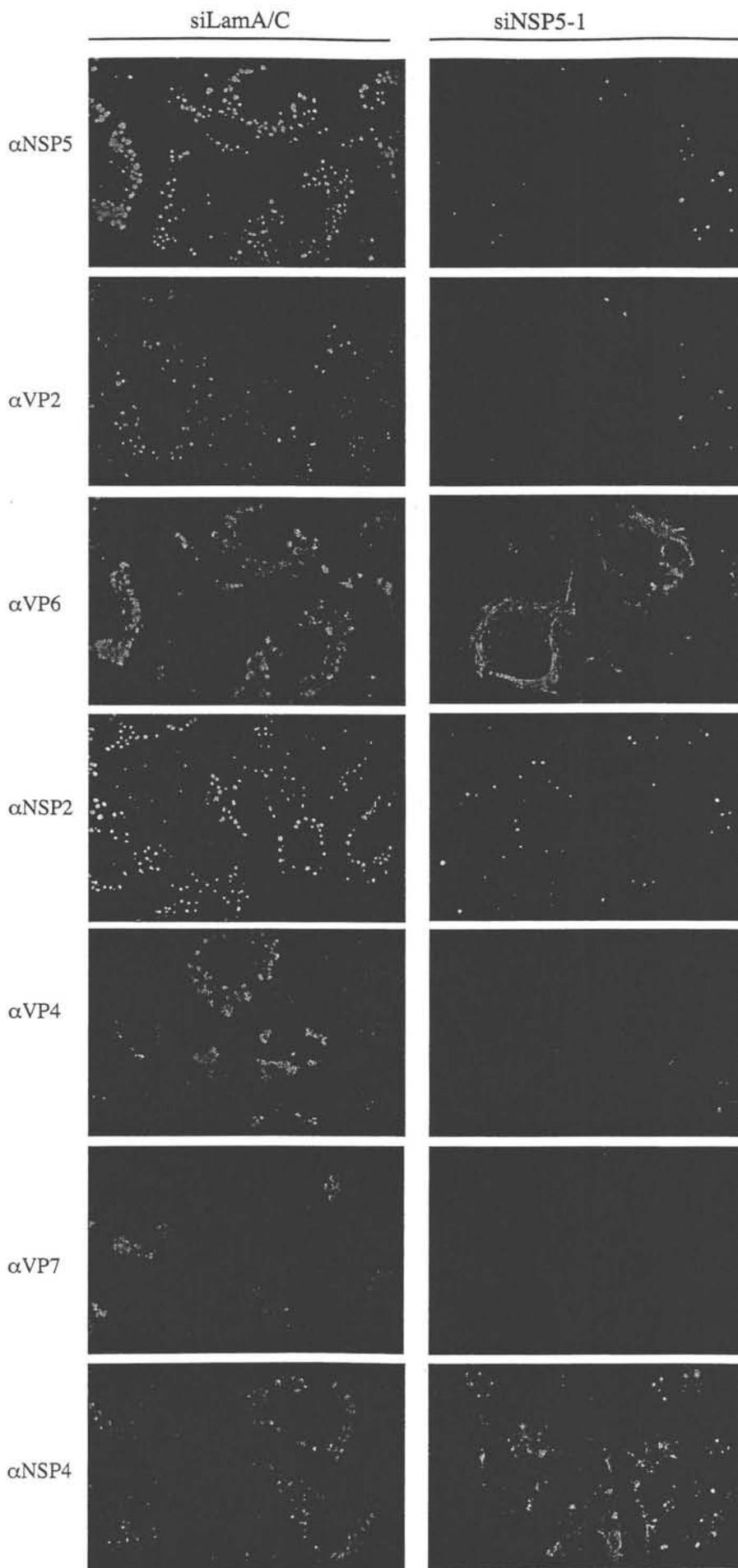


Figura 11. Distribución de proteínas virales en células transfectadas con el siNSP5-1. Células MA104 fueron transfectadas con los interferentes indicados e infectadas con RRV. 8 h.p.i. las células se procesaron para inmunofluorescencia, como se indica en materiales y métodos. Las proteínas virales fueron detectadas con los anticuerpos señalados. Como anticuerpo secundario se utilizó anti-conejo acoplado a Alexa 488 y anti-ratón acoplado a Alexa 568.

siNSP5-1

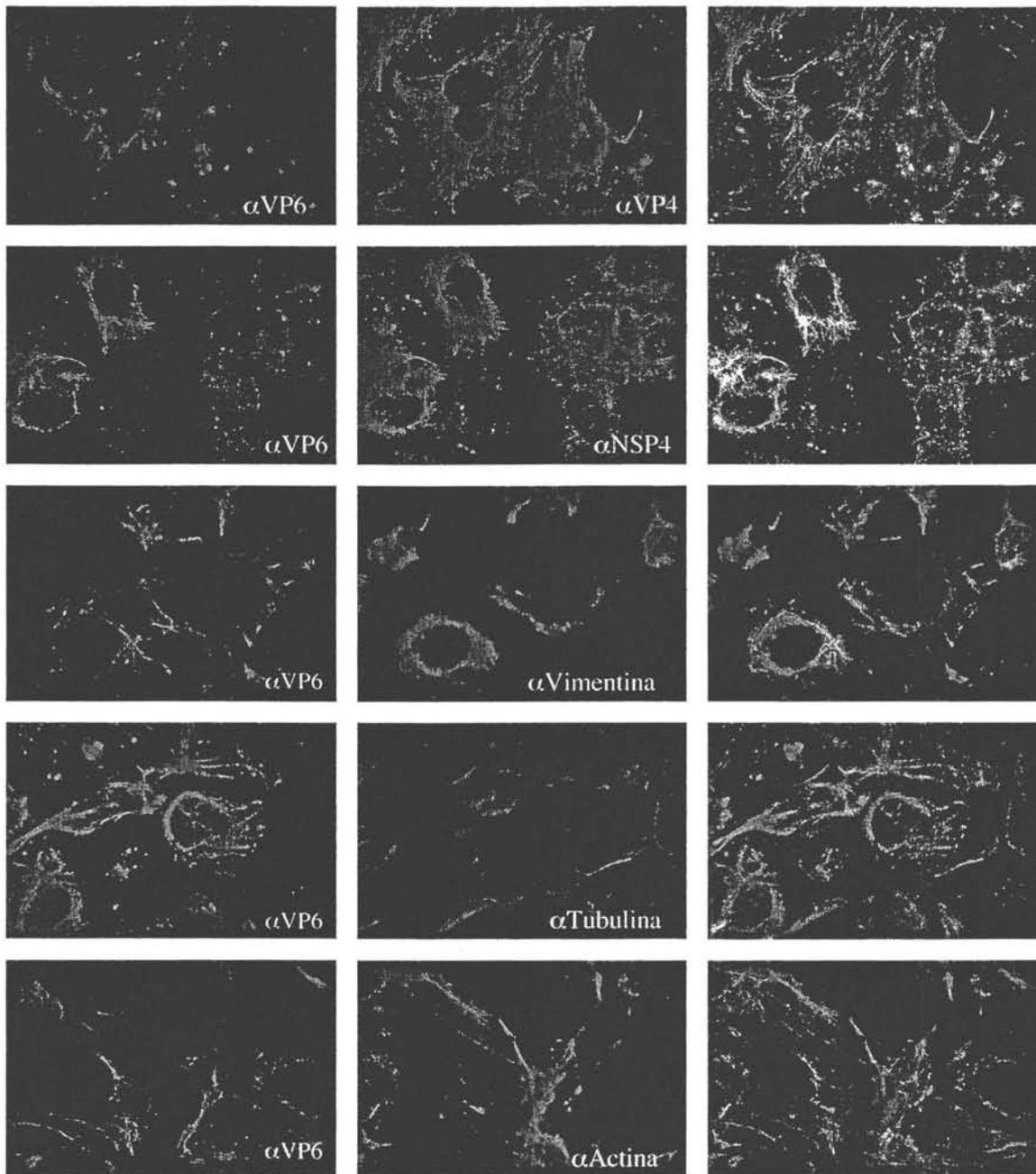
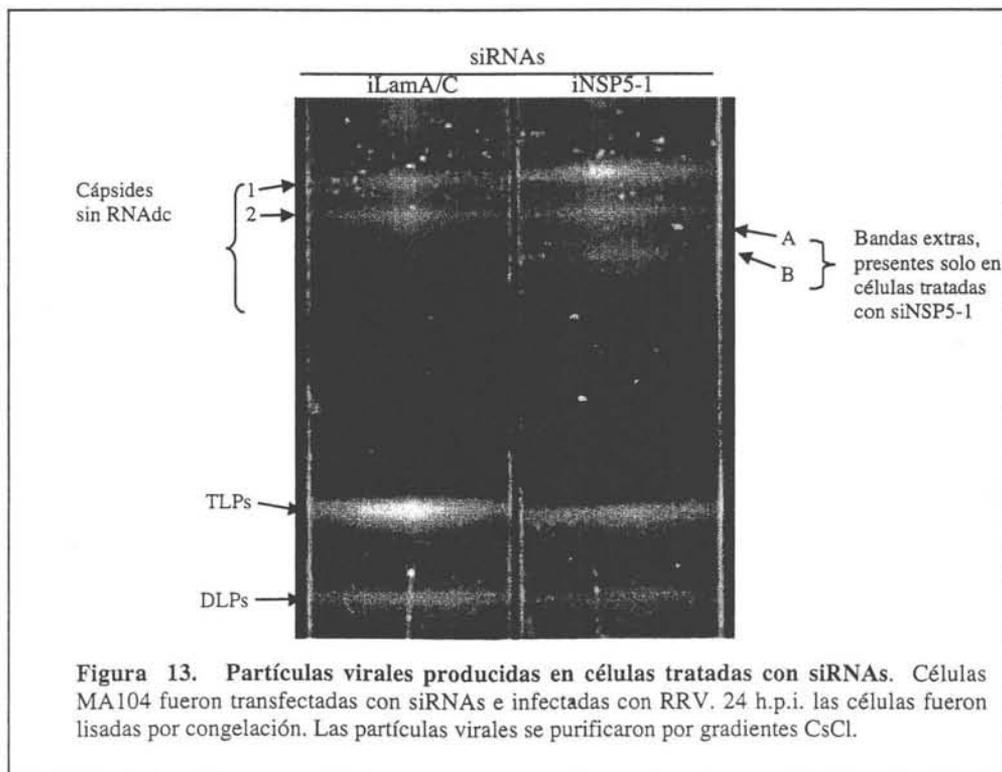


Figura 12. Colocalización de proteínas virales en células lipofectadas con siNSP5. Células MA104 fueron transfectadas con el siNSP5-1 e infectadas con RRV. 8 h.p.i. las células se procesaron para inmunofluorescencia. Los anticuerpos primarios se indican en la figura. Los anticuerpos secundarios fueron anti-conejo Alexa 488 y anti-ratón,568. Las imágenes fueron sobrelapadas con el programa Adobe Photoshop 7.

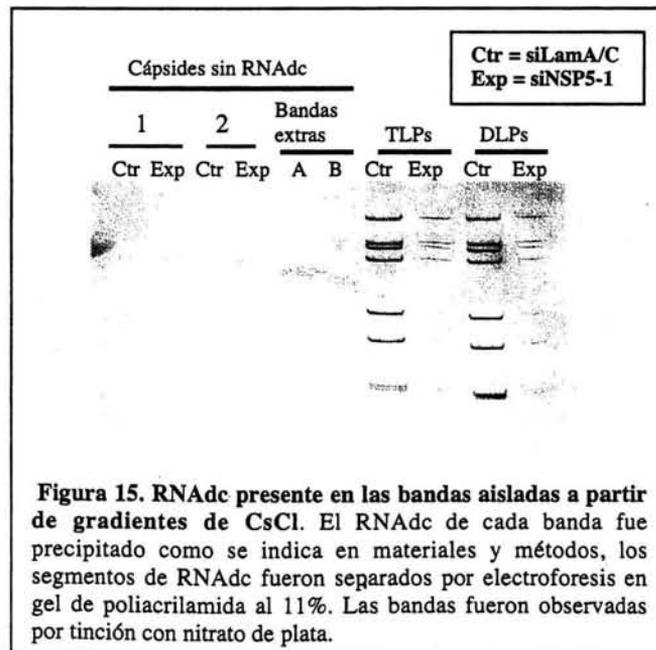
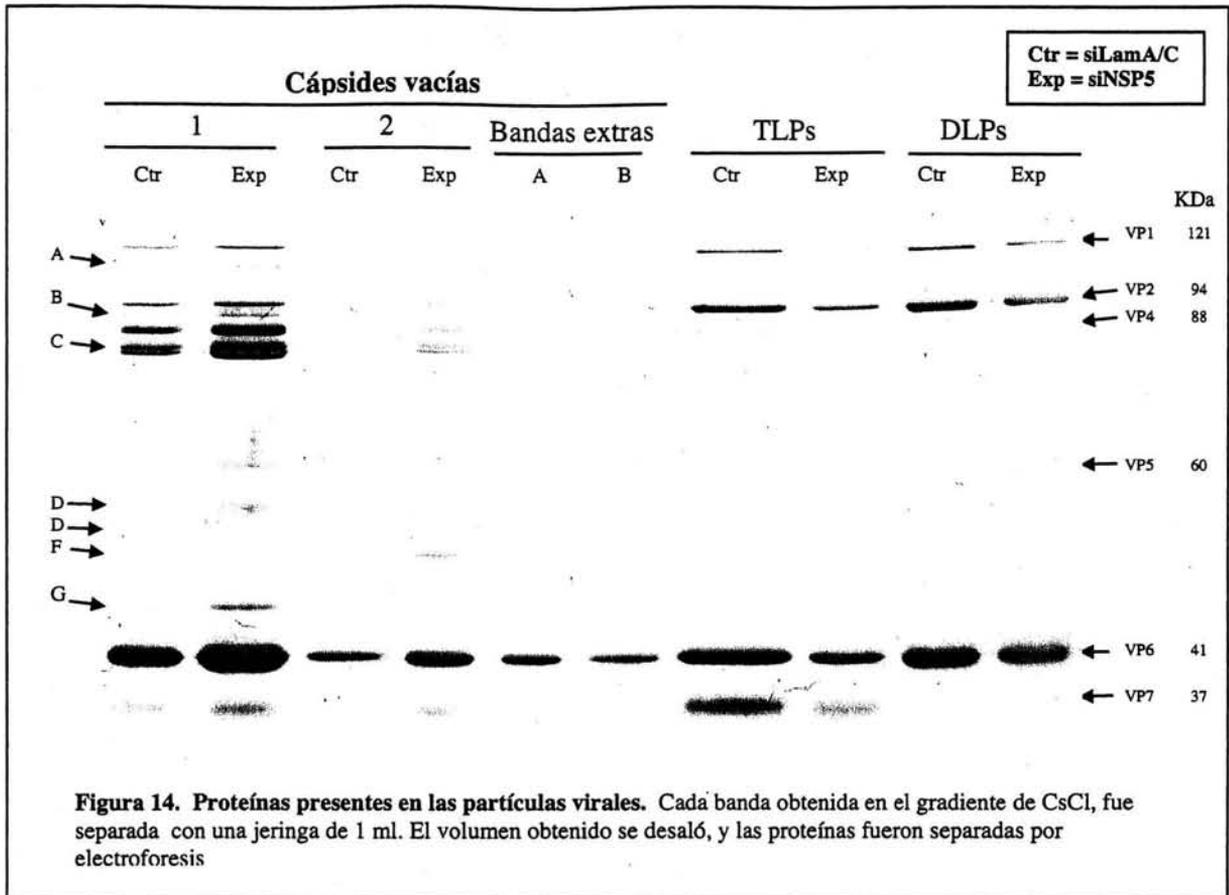
Producción de partículas virales en células interferidas para el gen 11.

Los experimentos anteriores muestran que la síntesis de RNAdc y la progenie de rotavirus disminuye considerablemente cuando las células son tratadas con el siNSP5-1, además de conducir a una reducción de viroplasmos. Estos resultados indicaban que en presencia de este interferente se producen menos partículas virales y para corroborarlo se aislaron en un gradiente de densidad de CsCl las partículas que se generaron en las células lipofectadas con el siNSP5-1 o siLamA/C e infectadas con el rotavirus RRV. En el gradiente correspondiente al experimento control de células lipofectadas con el siLamA/C; se observó que las bandas que corresponden a TLPs y DLPs son más intensas que las observadas en gradientes obtenidos a partir de células transfectadas con siNSP5-1 (Fig. 13).



Por el contrario, las bandas que se observan en la parte superior del gradiente, que corresponden a cápsides vacías son más intensas en el gradiente obtenido a partir de células tratadas con siNSP5-1, además de que se presentan bandas adicionales que no se encuentran en los controles (Fig. 13).

Para un análisis más detallado, cada banda observada en los gradientes de CsCl se aisló y la composición proteica de cada una se analizó por SDS-PAGE (Fig. 14). Como era de esperarse las bandas de DLPs, contienen las proteínas VP1, VP2 y VP6, las bandas de TLPs contienen las proteínas VP1, VP2, VP4, VP6 y VP7; sin embargo, la cantidad de proteínas virales es mayor en los gradientes controles (Fig. 14). Las bandas superiores de los gradientes contienen todas las proteínas de TLPs; además de una serie de proteínas (A-F) no caracterizadas que no se observan en TLPs, ni en DLPs. Es probable que las proteínas marcadas como B, C y G correspondan al corte proteolítico que sufre VP2 (Fig. 14) (9). Como se esperaba, el contenido de proteínas presente en las bandas que corresponden a cápsides es mayor en los gradientes obtenidos a partir de células tratadas con el siNSP5-1 (Fig. 14). Para confirmar que las bandas superiores carecen de genoma viral, se analizó el contenido de RNAdc de cada banda y como esperábamos, las bandas superiores del gradiente carecen de RNAdc (Fig. 15). Consistente con los datos mostrados en la Fig. 10, la cantidad de RNAdc es menor en las bandas que corresponden a TLPs y DLPs provenientes de células tratadas con el siNSP5-1. Estos datos sugieren que en células interferidas para el gen 11 se producen menos TLPs y menos DLPs, pero se producen más cápsides sin RNAdc.



DISCUSIÓN

En rotavirus no se han logrado realizar experimentos de genética reversa, por lo que la función de NSP5 y otras proteínas de rotavirus se han estudiado por métodos indirectos como: ensayos *in vitro*, selección y caracterización de variantes naturales, mutantes termosensibles y por rotavirus rearreglantes. Como alternativa la presente tesis tuvo como objetivo el estudio del gen 11 de rotavirus utilizando el sistema de RNAi. Se ha demostrado que este sistema funciona en células MA104 derivadas del epitelio de riñón del mono *Rhesus*, en las cuales se ha establecido el modelo de replicación de rotavirus. Además, la interferencia por siRNAs ha mostrado una alta especificidad por el RNAm blanco. El fenotipo dado por ausencia de las proteínas codificadas por el gen 11 se caracterizó en células MA104 transfectadas con el siNSP5-1 e infectadas con el rotavirus RRV.

Después de la entrada y pérdida de la capa externa de rotavirus, se inicia la transcripción del RNAm en las DLPs. La traducción de los RNAm produce proteínas virales que pueden formar viroplasmias y DLPs. Es probable que estas nuevas partículas, acumuladas en los viroplasmias, sinteticen más RNAm, lo que constituiría una transcripción secundaria (55). En células transfectadas con el siNSP5-1, el sistema de RNAi detecta y degrada el mensajero del gen 11, evitándose la síntesis de NSP5 y NSP6. Bajo la hipótesis de que existe una transcripción secundaria de RNAm, la reducción en número y tamaño de viroplasmias debido a la inhibición de NSP5, conduciría a una reducción de la transcripción secundaria, lo cual explicaría la reducción en la síntesis de todas las proteínas virales, cuando se interfiere la expresión del gen 11. Por otro lado, se ha propuesto que NSP5 regula si el RNAm se traduce o se replica, por lo que otra explicación para la disminución de proteínas virales es que la traducción de los mensajeros, sea ineficiente, ya sea por que el RNAm no llegue a la maquinaria traduccional o porque NSP5 se requiere para la

traducción de las proteínas de rotavirus. El efecto sobre la síntesis de proteínas también podría ser indirecto, la ausencia de NSP5 podría alterar la función de alguna(s) proteína(s) importante(s) en la síntesis de proteínas, por ejemplo la de NSP3, una proteína que se ha propuesto favorece la síntesis de proteínas virales al secuestrar la maquinaria de traducción celular.

Se ha propuesto que NSP5 y NSP2 forman una especie de andamio donde otras proteínas y RNA viral se acumulan para formar los viroplasmos (25). En células interferidas para NSP5 los viroplasmos disminuyen y es probable que esto origine los cambios en la distribución de VP6 (Fig. 11). En sistemas *in vitro* se ha descrito que VP6 puede formar estructuras tubulares (42), debido a esto es probable que en células tratadas con el siNSP5-1 exista cierta cantidad de VP6 que no llega a asociarse con viroplasmos y que está más disponible para acumularse en las formas filamentosas que observamos por inmunofluorescencia. Se ha descrito que durante una infección NSP4 se asocia a RE, y VP4 aunque no se asocia a RE, muestra una distribución similar a NSP4; sin embargo, estas proteínas también se han observado en menor cantidad en estructuras filamentosas asociadas a tubulina. NSP4 funciona como receptor de VP6 durante la gemación de las DLPs de los viroplasmos al RE, e interacciona con VP4 (61), de modo que no es extraño que las fibras de NSP4 colocalicen con las de VP4 y VP6. Las fibras formadas por estas proteínas se observan en toda la célula, lo cual puede sugerir que estas estructuras son citoplásmicas; sin embargo, no colocalizan con tubulina, vimentina ni actina, además, de que NSP4 tiene una señal de retención en RE, lo cual nos permite proponer que las fibras que observamos podrían estar asociadas a RE.

En células transfectadas con el siNSP5-1 observamos una reducción en la formación de viroplasmos, DLPs, TLPs, síntesis de RNAdc y un aumento en la formación de cápsides sin RNAdc, lo cual sugiere que NSP5, además de ser importante en la formación de viroplasmos, puede estar implicada en la replicación y empaquetamiento del genoma viral. Se ha propuesto que durante el ensamblaje de la partícula con actividad de replicasa, la polimerasa viral VP1 y la guanilil transferasa VP3 interactúan con el RNAm viral para formar un complejo pre-núcleo que carece de

actividad replicasa, y que en los viroplasmos estos complejos interactúan con dímeros de VP2, octámeros de NSP2 y multímeros de NSP5 formando una estructura que representa uno de los vértices del núcleo y que cuenta con actividad replicasa. En este modelo se ha sugerido que NSP2 funciona como un motor molecular que genera energía y que junto con NSP5 facilita el empaquetamiento del RNAm viral en la nucleocápside donde se replica (46). Basados en esto, es posible que en ausencia de NSP5 el RNAm no llegue a la maquinaria de replicación o que su ausencia genere una replicación ineficiente, eventos que explicarían la disminución en la síntesis del RNAdc, ya que al no estar NSP2 y NSP5 el RNAm no podría introducirse en los intermediarios de replicación que es en donde se replica el genoma, esto también explicaría el aumento en la formación de cápsides sin RNAdc. Alternativamente, otra causa que no excluye a la anterior es la disminución de las proteínas VP1 y VP3 que son importantes en la replicación del genoma. Otra opción para la formación de cápsides sin RNAdc es que la proteína, que no puede integrarse en viroplasmos debido a la falta de NSP5, forme estructuras parecidas a cápsides sin RNAdc, la cual se apoya en los trabajos en los que se ha reportado que proteínas estructurales de rotavirus en células de insecto (Sf9) son capaces de interactuar y formar estructuras similares a cápsides, esto en ausencia de proteínas no estructurales; sin embargo no se ha demostrado que esto ocurra en el contexto de una infección.

Nuestros resultados indican que el sistema de RNAi fue altamente específico para inhibir la expresión del gen 11 del rotavirus RRV, ya que observamos una disminución considerable en la síntesis de la proteína NSP5; sin embargo no logramos detectar la proteína NSP6, que también es codificada por el gen 11. A pesar de esto los resultados obtenidos los atribuimos a la ausencia de NSP5, ya que existen algunas cepas de rotavirus que no codifican para la proteína NSP6, pero que se replican de forma eficiente, lo cual sugiere que NSP6 no se requiere para la replicación de rotavirus o que otra proteína viral o celular puede sustituirla (49).

El análisis de la producción de genoma viral muestra que los 11 genes de rotavirus disminuyen cuando se interfiere la expresión del gen 11; sin embargo, uno de los resultados esperados era que la reducción en la síntesis del gen 11 fuera mayor a la observada con otros genes, debido a que el RNAm utilizado para la traducción o para la replicación estaría siendo degradado por el sistema RNAi. Los resultados obtenidos apoyan la hipótesis de que existe una clasificación de los RNAm que se dirigen a hacia la ruta de replicación y los que se dirigen a la traducción. Es probable que existan proteínas virales y/o celulares, que protegen los RNAm destinados a la replicación y esto podría ser una de las estrategias virales para impedir que los RNAm de rotavirus sean reconocidos y degradados por el sistema de RNAi u otros mecanismos celulares.

CONCLUSIONES

- El siNSP5-1 inhibe específicamente la expresión del gen 11 del rotavirus RRV.
- NSP5 es una proteína esencial en el ciclo de replicación de rotavirus.
- NSP5 es una proteína importante para la formación de viroplasmatas.
- La inhibición de la síntesis de NSP5 conduce a una reducción en la producción de progenie viral, así como en la síntesis de las proteínas VP2, VP4, VP6, VP7, NSP2 y NSP4, síntesis de RNAdc, la formación de TLPs y DLPs, así como un aumento en la producción de cápsides sin RNAdc.
- La disminución en la síntesis de proteínas, RNAdc, formación de TLPs y DLPs, puede ser explicada por la disminución de viroplasmatas, lugar que en el que se lleva a cabo la replicación viral, inicio de la morfogénesis y donde se ha propuesto que se lleva a cabo la transcripción secundaria.
- Alternativamente, NSP5 podría tener un papel regulador en la traducción y/o replicación del RNAm, evento que también explicaría la disminución en la síntesis de proteínas y RNAdc.
- El cambio en la distribución de proteínas virales, sugiere que los viroplasmatas son importantes para mantener una organización adecuada de las proteínas asociadas a ellos.
- Sin embargo no descartamos que parte del fenotipo observado se deba a la inhibición de la síntesis NSP6, otra proteína codificada por el gen 11 de rotavirus.

PERSPECTIVAS

- Análisis de las partículas formadas en ausencia de la proteína NSP5
- Realizar el rescate fenotípico del rotavirus RRV, expresando la proteína NSP5 de una cepa de rotavirus que no sea sensible a la inhibición por siNSP5-1, como por ejemplo Wa, en células MA104. Este sistema permitiría realizar experimentos de genética reversa.
- Si el rescate fenotípico funciona como se espera, se podrían alterar por mutagénesis dirigida algunos dominios de la proteína que han sido implicados en funciones importantes.
- Generar una línea celular que exprese los siNSP5-1, con el objetivo de aumentar el porcentaje de células en las que se activa la respuesta por RNAi cuando se infecta con RRV.

Bibliografía

1. Afrikanova, I., E. Fabbretti, et al. (1998). "Rotavirus NSP5 phosphorylation is up-regulated by interaction with NSP2." *J Gen Virol* 79 (Pt 11): 2679-86.
2. Afrikanova, I., M. C. Miozzo, et al. (1996). "Phosphorylation generates different forms of rotavirus NSP5." *J Gen Virol* 77 (Pt 9): 2059-65.
3. Bass, B. L. (2001). "RNA interference. The short answer." *Nature* 411(6836): 428-9.
4. Baulcombe, D. (2001). "RNA silencing. Diced defence." *Nature* 409(6818): 295-6.
5. Berois, M., C. Sapin, et al. (2003). "Rotavirus nonstructural protein NSP5 interacts with major core protein VP2." *J Virol* 77(3): 1757-63.
7. Billy, E., V. Brondani, et al. (2001). "Specific interference with gene expression induced by long, double-stranded RNA in mouse embryonal teratocarcinoma cell lines." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(25): 14428-33.
8. Blackhall, J., A. Fuentes, et al. (1997). "Serine protein kinase activity associated with rotavirus phosphoprotein NSP5." *J Virol* 71(1): 138-44.
9. Blackhall, J., M. Munoz, et al. (1998). "Analysis of rotavirus nonstructural protein NSP5 phosphorylation." *J Virol* 72(8): 6398-405.
10. Brussow, H., A. Bruttin, et al. (1990). "Polypeptide composition of rotavirus empty capsids and their possible use as a subunit vaccine." *J Virol* 64(8): 3635-42.
11. Caplen, N. J. (2002). "A new approach to the inhibition of gene expression." *Trends Biotechnol* 20(2): 49-51.
12. Caplen, N. J., S. Parrish, et al. (2001). "Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(17): 9742-7.
13. Carmichael, G. G. (2002). "Medicine: silencing viruses with RNA." *Nature* 418(6896): 379-80.
14. Charpilienne, A., J. Lepault, et al. (2002). "Identification of rotavirus VP6 residues located at the interface with VP2 that are essential for capsid assembly and transcriptase activity." *J Virol* 76(15): 7822-31.
15. Chen, D. and J. T. Patton (1998). "Rotavirus RNA replication requires a single-stranded 3' end for efficient minus-strand synthesis." *J Virol* 72(9): 7387-96.
16. Chnaiderman, J., J. Diaz, et al. (1998). "Characterization of a rotavirus rearranged gene 11 by gene reassortment." *Arch Virol* 143(9): 1711-22.
17. Chnaiderman Xiao, J., M. Barro, et al. (2002). "NSP5 phosphorylation regulates the fate of viral mRNA in rotavirus infected cells." *Arch Virol* 147(10): 1899-911.

18. Ciarlet, M. and M. K. Estes (2001). "Interactions between rotavirus and gastrointestinal cells." *Curr Opin Microbiol* 4(4): 435-41.
19. Dector, M. A., P. Romero, et al. (2002). "Rotavirus gene silencing by small interfering RNAs." *EMBO Rep* 3(12): 1175-80.
20. Devroe, E. and P. A. Silver (2002). "Retrovirus-delivered siRNA." *BMC Biotechnol* 2(1): 15.
21. Donze, O. and D. Picard (2002). "RNA interference in mammalian cells using siRNAs synthesized with T7 RNA polymerase." *Nucleic Acids Res* 30(10): e46.
22. with T7 RNA polymerase." *Nucleic Acids Res* 30(10): e46.
23. Eichwald, C., F. Vascotto, et al. (2002). "Rotavirus NSP5: mapping phosphorylation sites and kinase activation and viroplasm localization domains." *J Virol* 76(7): 3461-70.
24. Erk, I., J. C. Huet, et al. (2003). "A zinc ion controls assembly and stability of the major capsid protein of rotavirus." *J Virol* 77(6): 3595-601.
25. Escobar, M. A., E. L. Civerolo, et al. (2001). "RNAi-mediated oncogene silencing confers resistance to crown gall tumorigenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(23): 13437-42.
26. Estes, M. K. and J. Cohen (1989). "Rotavirus gene structure and function." *Microbiol Rev* 53(4): 410-49.
27. Fabbretti, E., I. Afrikanova, et al. (1999). "Two non-structural rotavirus proteins, NSP2 and NSP5, form viroplasm-like structures in vivo." *J Gen Virol* 80 (Pt 2): 333-9.
28. Gilber, J. M., N. Feng, et al. (2001). "Rotavirus assembly - interaction of surface protein VP7 with middle layer protein VP6." *Arch Virol* 146(6): 1155-71.
29. Gitlin, L., S. Karel'sky, et al. (2002). "Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells." *Nature* 418(6896): 430-4.
30. Gonzalez, R. A., R. Espinosa, et al. (2000). "Relative localization of viroplasmic and endoplasmic reticulum-resident rotavirus proteins in infected cells." *Arch Virol* 145(9): 1963-73.
31. Gonzalez, R. A., M. A. Torres-Vega, et al. (1998). "In vivo interactions among rotavirus nonstructural proteins." *Arch Virol* 143(5): 981-96.
32. Gonzalez, S. A. and O. R. Burrone (1991). "Rotavirus NS26 is modified by addition of single O-linked residues of N-acetylglucosamine." *Virology* 182(1): 8-16.
33. Hannon, G. J. (2002). "RNA interference." *Nature* 418(6894): 244-51.
34. Jayaram, H., Z. Taraporewala, et al. (2002). "Rotavirus protein involved in genome replication and packaging exhibits a HIT-like fold." *Nature* 417(6886): 311-5.
35. Kim, Y., K. O. Chang, et al. (2002). "Production of hybrid double- or triple-layered virus-like particles of group A and C rotaviruses using a baculovirus expression system." *Virology* 302(1): 1-8.
36. Lepault, J., I. Petitpas, et al. (2001). "Structural polymorphism of the major capsid protein of rotavirus." *Embo J* 20(7): 1498-507.

37. Liu, M., N. M. Mattion, et al. (1992). "Rotavirus VP3 expressed in insect cells possesses guanylyltransferase activity." *Virology* 188(1): 77-84.
38. Martens, H., J. Novotny, et al. (2002). "RNAi in Dictyostelium: the role of RNA-directed RNA polymerases and double-stranded RNase." *Mol Biol Cell* 13(2): 445-53.
39. Mattion, N. M., D. B. Mitchell, et al. (1991). "Expression of rotavirus proteins encoded by alternative open reading frames of genome segment 11." *Virology* 181(1): 295-304.
40. Mirazimi, A., K. E. Magnusson, et al. (2003). "A cytoplasmic region of the NSP4 enterotoxin of rotavirus is involved in retention in the endoplasmic reticulum." *J Gen Virol* 84(Pt 4): 875-83.
41. Mitzel, D. N., C. M. Weisend, et al. (2003). "Translational regulation of rotavirus gene expression." *J Gen Virol* 84(Pt 2): 383-91.
42. Mohan, K. V. and C. D. Atreya (2001). "Nucleotide sequence analysis of rotavirus gene 11 from two tissue culture-adapted ATCC strains, RRV and Wa." *Virus Genes* 23(3): 321-9.
43. Nilsson, M., C. H. von Bonsdorff, et al. (1998). "Assembly of viroplasm and virus-like particles of rotavirus by a Semliki Forest virus replicon." *Virology* 242(2): 255-65.
44. López S. y Arias CF. Los rotavirus. En <http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/cap17/>
45. Padilla-Noriega, L., O. Paniagua, et al. (2002). "Rotavirus protein NSP3 shuts off host cell protein synthesis." *Virology* 298(1): 1-7.
46. Patton, J. T. (1995). "Structure and function of the rotavirus RNA-binding proteins." *J Gen Virol* 76 (Pt 11): 2633-44.
47. Patton, J. T. (2001). "Rotavirus RNA replication and gene expression." *Novartis Found Symp* 238: 64-77; discussion 77-81.
48. Patton, J. T., M. T. Jones, et al. (1997). "Rotavirus RNA polymerase requires the core shell protein to synthesize the double-stranded RNA genome." *J Virol* 71(12): 9618-26.
49. Patton, J. T. and E. Spencer (2000). "Genome replication and packaging of segmented double-stranded RNA viruses." *Virology* 277(2): 217-25.
50. Patton, J. T., M. Wentz, et al. (1996). "cis-Acting signals that promote genome replication in rotavirus mRNA." *J Virol* 70(6): 3961-71.
51. Pesavento, J. B., J. A. Lawton, et al. (2001). "The reversible condensation and expansion of the rotavirus genome." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(4): 1381-6.
52. Piron, M., P. Vende, et al. (1998). "Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4GI and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F." *Embo J* 17(19): 5811-21.
53. Raming, R., Petrie, B. (1984) "Characterization of temperature-sensitive mutants of simian rotavirus SA11: protein synthesis and morphogenesis." *J Virol*:665-673.
54. Poncet, D., P. Lindenbaum, et al. (1997). "In vivo and in vitro phosphorylation of rotavirus NSP5 correlates with its localization in viroplasms." *J Virol* 71(1): 34-41.

55. Silvestri L, Taraporewala Z and Patton JT. 2004 "Rotavirus Replication: Plus-sense Templates for double-stranded RNA synthesis are made in viroplasm." *In pres.*
56. Schuck, P., Z. Taraporewala, et al. (2001). "Rotavirus nonstructural protein NSP2 self-assembles into octamers that undergo ligand-induced conformational changes." *J Biol Chem* 276(13): 9679-87.
57. Taraporewala, Z., D. Chen, et al. (1999). "Multimers formed by the rotavirus nonstructural protein NSP2 bind to RNA and have nucleoside triphosphatase activity." *J Virol* 73(12): 9934-43.
58. Torres-Vega, M. A., R. A. Gonzalez, et al. (2000). "The C-terminal domain of rotavirus NSP5 is essential for its multimerization, hyperphosphorylation and interaction with NSP6." *J Gen Virol* 81(Pt 3): 821-30.
59. Vasquez, M., A. M. Sandino, et al. (1993). "Function of rotavirus VP3 polypeptide in viral morphogenesis." *J Gen Virol* 74 (Pt 5): 937-41.
60. Vende, P., Z. F. Taraporewala, et al. (2002). "RNA-binding activity of the rotavirus phosphoprotein NSP5 includes affinity for double-stranded RNA." *J Virol* 76(10): 5291-9.
61. Vende, P., M. A. Tortorici, et al. (2003). "Rotavirus NSP2 interferes with the core lattice protein VP2 in initiation of minus-strand synthesis." *Virology* 313(1): 261-73.
62. Waterhouse, P. M., M. B. Wang, et al. (2001). "Gene silencing as an adaptive defence against viruses." *Nature* 411(6839): 834-42.
63. Wood, K. J. and J. Fry (1999). "Gene therapy: potential applications in clinical transplantation." *Expert Rev Mol Med* 1999: 1-20.
64. Xu, A., A. R. Bellamy, et al. (2000). "Immobilization of the early secretory pathway by a virus glycoprotein that binds to microtubules." *Embo J* 19(23): 6465-74.
65. Zeng, C. Q., M. Labbe, et al. (1994). "Characterization of rotavirus VP2 particles." *Virology* 201(1): 55-65.
66. Zhang, M., C. Q. Zeng, et al. (2000). "A functional NSP4 enterotoxin peptide secreted from rotavirus-infected cells." *J Virol* 74(24): 11663-70.