



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**Generación de una línea celular que inhibe la
expresión de una proteína de Rotavirus**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
HÉCTOR VICENTE RAMÍREZ GÓMEZ

TUTOR PRINCIPAL:
DRA. SUSANA LÓPEZ CHARRETÓN
Instituto de Biotecnología-UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
DR. JOSÉ LUIS PUENTE GARCÍA
Instituto de Biotecnología-UNAM
DR. LORENZO SEGOVIA FORCELLA
Instituto de Biotecnología-UNAM

MÉXICO, D.F. Junio del 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Genética y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría de la Dra. Susana López Charretón. El proyecto contó con el apoyo de los donativos IN2114113 de la DGAPA/UNAM y 153639 de CONACyT. Durante la realización de este trabajo se contó con una beca otorgada por CONACYT.

A mi abuelo. In memoriam

*"...estás muerto
estás vivo
estás cayendo
estás nube
estás lluvia
estás estrella*

*donde estés
si es que estás
si estás llegando*

*aprovecha por fin
a respirar tranquilo
a llenarte de cielo los pulmones*

*donde estés si es que estás
si estás llegando
será una pena que no exista Dios*

*pero habrá otros
claro que habrá otros
dignos de recibirte..."*

Mario Benedetti

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la *Dra. Susana López Charretón* y al *Dr. Carlos Arias* por permitirme realizar este trabajo en su laboratorio. Agradezco especialmente a la *Dra. Susana López Charretón* por soportar mis horarios nocturnos (muy a su pesar), por los atinados consejos en la biología molecular del proyecto y por su tutoría en general. Al grupo Arias/López por las enseñanzas de muchos de sus integrantes y por compartir esta etapa a mi lado. Al *Dr. Tomás López Díaz* por su ayuda franca y desinteresada, por los maravillosos consejos experimentales y por ser un académico siempre dispuesto a ayudar al estudiante. Al *Dr. Pavel Isa* por sus comentarios ácidos pero generalmente atinados. Al *Dr. Ernesto Méndez Salinas[†]*, que siempre que me acerqué tuvo tiempo para ayudarme e incluso bromear conmigo. A la *Dra. Andrea Peralta* por sus consejos en la biología celular y por el plásmido que salvó el proyecto.

A *Rafaela Espinosa (Rafa)* por su gran ayuda en cultivo celular y por todas sus enseñanzas del laboratorio. A *Pedro Romero (Don Pedro)* por su ayuda incondicional y asesoría cada vez que me atoraba con las construcciones, gracias por ser el Sr. Miyagi de la biología molecular, por contagiarnos de su alegría y por no perder la oportunidad de vacilarnos siempre.

A mis sinodales, el *Dr. Lorenzo Segovia Forcella* y el *Dr. José Luis Puente García*, por el apoyo, los consejos y la comprensión que siempre tuvieron conmigo.

A los doctores *Gustavo Pedraza*, *Mario Cruz*, *Ramón González*, *Enrique Salas* y *Gustavo Martínez* por el tiempo dedicado a las correcciones, a los comentarios y a los consejos para ser mejor.

A la Unidad de Síntesis y Secuenciación del IBt-UNAM por toda la ayuda proporcionada, especialmente al *Dr. Paul Gaytán* por la ayuda en lo más fundamental del proyecto.

Quiero agradecer especialmente a las personas que siempre estuvieron ahí cuando los necesité: *Rodrigo, Marco Aurelio, Ciro, Ana Paola, David, Dan, Fernando, Cuauhtemoc, Álvaro, Luis y Lisi*. Gracias por todo, ustedes lo saben.

A mi papás por partirse el lomo para que yo pudiera llegar hasta aquí, por los sacrificios para que pudiera terminar la maestría sin beca y por todo el amor del que he gozado, jamás lo hubiera logrado sin ustedes. A mis dos hermanos menores por ayudar en lo que pudieron y por estar ahí siempre. Ya verán que algún día la revolución nos hará justicia.

Y por último quiero agradecer a todas las decenas de personas que a pesar de no haber ayudado directamente en este proyecto, estuvieron en mi vida durante esta etapa y permitieron mi desarrollo.

Gracias a todos, de corazón

Héctor Ramírez

***Generación de una línea celular que inhibe la
expresión de una proteína de rotavirus***

INDICE

RESUMEN	12
ABREVIATURAS	14
INTRODUCCIÓN	16
ANTECEDENTES	24
HIPÓTESIS	26
OBJETIVO GENERAL	26
OBJETIVOS PARTICULARES	26
MATERIALES Y MÉTODOS	28
RESULTADOS	36
INFECCIÓN DE COS7 POR RRV	36
CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR QUE CODIFICA PARA EL SHRNA	37
DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN CRÍTICA DE PUOMICINA Y DE LA DENSIDAD CELULAR ÓPTIMA ..	40
TRANSFECCIÓN DE COS7 CON pSILENCER Y SELECCIÓN DE LA LÍNEA QUE EXPRESA EL SHRNA.....	40
EVALUACIÓN DEL SHRNA EN LAS LÍNEAS CELULARES.....	41
EVALUACIÓN DE LA LÍNEA COS7-SHGFP.....	46
EVALUACIÓN DE LA LÍNEA COS7-SHNSP3.....	47
DISCUSIÓN	52
CONCLUSIONES	58
PERSPECTIVAS	60
APÉNDICE A	62
BIBLIOGRAFÍA	64

RESUMEN

El estudio de los rotavirus por medio de diversas técnicas ha permitido una comprensión más completa de la biología de estos virus y de la función de cada una de sus proteínas. Una de las herramientas más fuertes en el estudio de la función de las proteínas de rotavirus ha sido el uso de RNA's de interferencia (siRNA's), que involucra una serie de factores celulares que culminan en la degradación del RNA mensajero contra el que está dirigido dicho siRNA, y por lo tanto la inhibición de la expresión de la proteína blanco. Sin embargo, esta herramienta de interferencia de RNA (RNAi) posee algunas limitaciones ya que nunca se transfecta el 100% de las células, y aunado a ello algunos siRNA's no apagan por completo la expresión de la proteína blanco en las células transfectadas. Es por eso que el uso de vectores que permiten la expresión estable shRNA's ha resultado de mucha utilidad en los últimos años, abriendo las puertas a la generación de líneas celulares que inhiban de manera estable la expresión de diversas proteínas.

En este proyecto se desarrolló una herramienta para el estudio de la proteína NSP3 de rotavirus: una línea celular que expresa establemente un shRNA dirigido contra NSP3. Esta línea podrá ser usada para estudiar la función de cada uno de los dominios de la proteína NSP3, y nos permitirá estudiar la proteína en presencia de todas las proteínas virales, *i.e.* en el contexto de la infección. Lo anterior da pie a la posible generación de líneas celulares capaces de inhibir cada una de las proteínas de rotavirus, para el estudio de su función.

ABREVIATURAS

ATCC	Del inglés <i>American Type Culture Collection</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
CAP	Nucleótido de guanina modificado que se adiciona en el extremo 5' del RNA mensajero.
CMV	Citomegalovirus
COOH	Carboxilo
<i>e.g.</i>	Del latín <i>exempli gratia</i> , que significa <i>por ejemplo</i>
eIF4G	Factor Eucarionte 4G de inicio de la traducción
<i>i.e.</i>	Del latín <i>id est</i> , que significa <i>ésto es</i>
IRF's	Interferon Regulatory Factors
min	Minutos
MOI	Multiplicidad de infección (del inglés <i>Multiplicity Of Infection</i>)
mut	Mutante
NH ₂	Amino
nm	Nanómetro
nt	Nucleótido
ORF	Marco de lectura abierto (del inglés <i>Open Reading Frame</i>)
PABP	Proteína de unión a poli A (del inglés <i>Poly A Binding Protein</i>)
p.i	Post-infección
p.s.t	Post-transfección
pSilencer-shNSP3	pSilencer 4.1-CVM Puro/shNSP3
pSilencer-GFP	pSilencer 4.1-CMV Puro/shGFP
RNA	Ácido Ribonucleico

ssRNA	RNA de cadena sencilla (del inglés <i>single stranded RNA</i>)
dsRNA	RNA de cadena doble (del inglés <i>double stranded RNA</i>)
siRNA	RNA pequeño de interferencia (del inglés <i>small interfering RNA</i>)
mRNA	RNA mensajero
miRNA	Ácido Ribonucleico micro
shRNA	RNA pequeño tipo pasador o tallo-asa (del inglés <i>short hairpin RNA</i>)
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por RNA (del inglés <i>RNA-Induced Silencing Complex</i>)
rpm	Revoluciones por minuto
RRV	Cepa de Rotavirus de mono Rhesus
seg	Segundo
SFB	Suero Fetal Bovino
shGFP	shRNA dirigido contra GFP
shNSP3	shRNA dirigido contra NSP3
TLP's	Partículas virales de triple capa (del inglés <i>Triple Layered Particles</i>)
UFF	Unidades Formadoras de Focos
UTR's	Regiones no traducidas (del inglés <i>UnTranslated Regions</i>)

INTRODUCCIÓN

Los rotavirus se han clasificado en 7 grupos o serogrupos (de la A a la G), dependiendo de su serotipo, esta clasificación permite la existencia de múltiples serotipos dentro del mismo serogrupo. Sólo los grupos A, B y C son capaces de infectar tanto a animales como a humanos, y los grupos D-G sólo se han encontrado en animales (Fields et al, 2006). El grupo más ampliamente estudiado es el grupo A y es el objeto de estudio de este trabajo, ya que usamos la cepa RRV de rotavirus.

Los rotavirus del grupo A son los principales agentes causales de gastroenteritis en humanos y animales jóvenes. En países subdesarrollados las cepas humanas son responsables de cerca de 453,000 muertes al año (Tate et al, 2012). Estos virus de estructura icosaédrica pertenecen a la familia *Reoviridae*, y su genoma de RNA de doble cadena está compuesto de 11 segmentos que codifican 6 proteínas estructurales (VP1-VP4, VP6-VP7) y 6 proteínas no estructurales (NSP1-NSP6) (**Figura 1**). Dentro del genoma, cada RNA de polaridad positiva (mRNA) posee en el extremo 5' un CAP, seguido de una serie de secuencias conservadas que son parte de la región no traducida 5' (5'-UTR, por sus siglas en inglés), y no poseen poli-A en el 3'-UTR. Los UTR's de los mRNA's de rotavirus son pequeños y altamente conservados entre los genes de estos virus. El genoma está envuelto por 3 capas concéntricas de proteína. Las partículas infecciosas completas (viriones), de alrededor de 100 nm de diámetro, también llamados TLP's (del inglés: *Triple-Layered Particles*) poseen a las proteínas VP7 y VP4 en su exterior, y son las proteínas que median la infección celular. Las DLP's (del inglés: *Doubled-Layered Particles*), que carecen de la tercera capa, son transcripcionalmente activas y en su exterior se componen sólo de la proteína VP6. La capa más interna, que es la que envuelve al genoma, está formada por la proteína VP2 en su exterior y las proteínas VP1 y VP3 en su interior (Fields et al, 2006) (**Figura 1**).

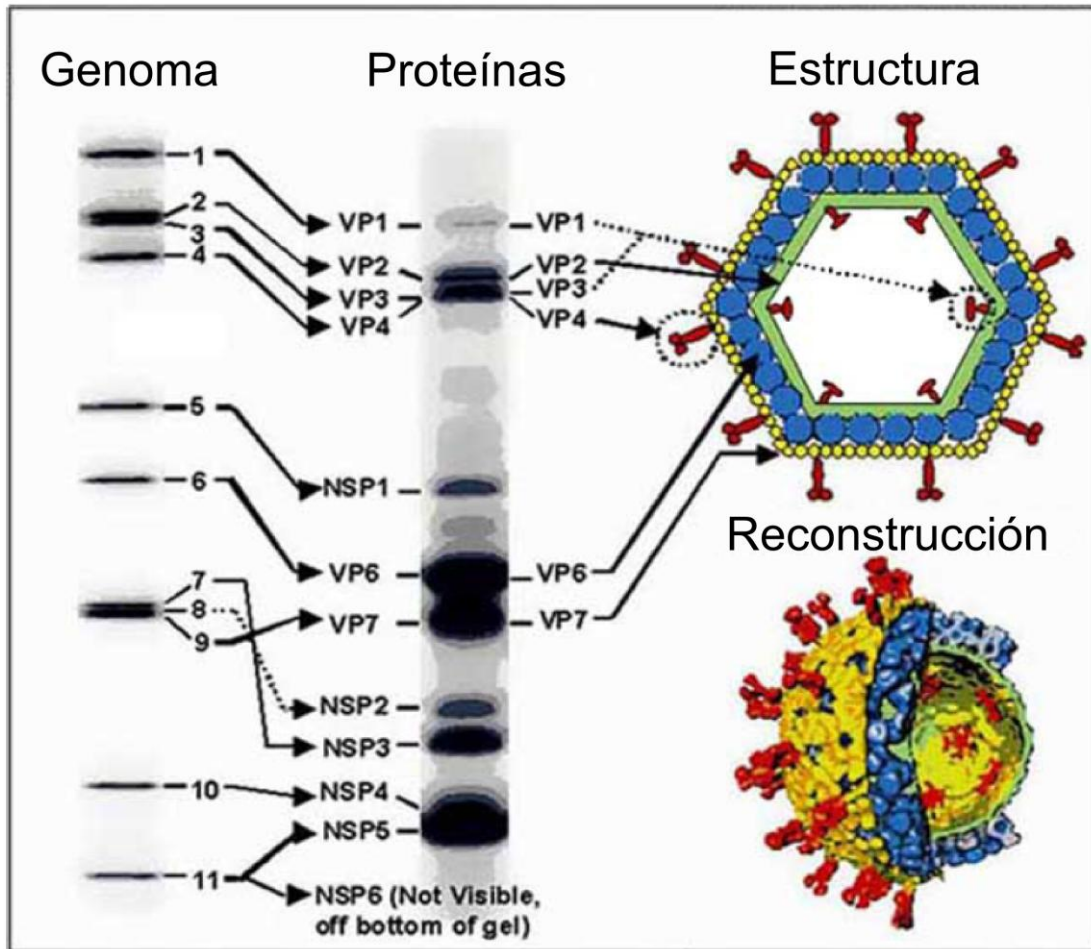


Figura 1. Genoma, proteínas y estructura de los Rotavirus. *Izquierda:* Gel de poliacrilamida con los 11 segmentos de dsRNA que componen al genoma. *En medio:* Proteínas codificadas por dichos segmentos. *Superior derecha:* Esquema de la posición de las proteínas estructurales. *Inferior derecha:* Estructura tridimensional del virión mostrando las 3 capas. *Modificado de (Patton et al, 2004).*

Proteínas estructurales

La proteína VP1, junto con la proteína VP3, forma heterodímeros anclados a la superficie interna de VP2 en cada uno de los 12 vértices de la partícula viral (**Figura 1**). La proteína VP1 es la responsable de la actividad RNA polimerasa-RNA dependiente (*RdRP*, por sus siglas en inglés), mientras que VP3 adiciona el *cap* (7-metilguanosina unida 5'-5') a los extremos 5' de los mRNA's virales, ya que posee actividad de guanilil-metil-transferasa. La proteína VP2 tiene actividad de unión a RNA y es la responsable de formar el *core* viral. Por lo tanto, se sugiere que la principal función de la capa interna de la cápside de rotavirus

debe ser la de dirigir la organización estructural del genoma, necesaria para la transcripción del mismo en células infectadas (Jayaram et al, 2004).

La proteína VP6 posee dominios de unión a VP7 y a VP2 que le permiten formar la capa intermedia. En la capa formada por VP6 se encuentran canales por donde se ha propuesto que salen los mRNA's virales para su traducción (Jayaram et al, 2004).

Se piensa que la glicoproteína VP7, que forma la capa más externa del virión, está involucrada en la interacción con diferentes proteínas de entrada del virión a la célula. Sin embargo, se sabe que la principal responsable de las interacciones durante la entrada es la proteína VP4, la cual es procesada por proteólisis dando lugar a las proteínas VP5 y VP8 (Arias et al, 1996; Lopez et al, 1985). Durante la entrada de rotavirus la proteína VP8 interacciona con receptores que contienen ácido siálico (SA), y posteriormente la proteína VP5 interacciona con las integrinas $\alpha 2\beta 1$, $\alpha V\beta 3$, $\alpha X\beta 2$ y posteriormente con HSC70, todos estos receptores están presentes en balsas lipídicas (Arias et al, 2002; Guerrero et al, 2002; Guerrero et al, 2000; Zarate et al, 2000). Posterior a estas interacciones iniciales se han encontrado diferentes vías de entrada para rotavirus del grupo A.

Proteínas no estructurales

El virus codifica para 6 proteínas no estructurales (NSP1-NSP6) y sus funciones se llevan a cabo en el citoplasma celular durante la infección. Estas proteínas participan principalmente en interacciones con proteínas de la célula huésped para favorecer la infección y la replicación viral (Taraporewala & Patton, 2004).

La proteína NSP1 parece estar implicada en la modulación de la respuesta a interferón, ya que al poseer actividad de E3-ligasa es capaz de enviar a degradación a diferentes factores celulares, *e.g.* varios IRF's (Sherry, 2009).

NSP2 es una enzima multifuncional que posee una serie de actividades (unión a ssRNA, helicasa, NTPasa, etc), y se piensa que su papel principal es llevado a cabo en la formación

de viroplasma (Fabbretti et al, 1999) y en la replicación/encapsidación del genoma (Taraporewala & Patton, 2001). La proteína NSP5 participa en la formación de viroplasma en conjunto con NSP2 (Fabbretti et al, 1999)

Se ha propuesto que la proteína NSP3 facilita la traducción de los mRNA's virales y que inhibe la síntesis de proteínas celulares funcionando como un antagonista de PABP (Keryer-Bibens et al, 2009; Piron et al, 1998).

A pesar de que la función de la proteína NSP4 aún no se ha aclarado, parece ser esencial para la replicación, transcripción y morfogénesis viral, sin embargo el mecanismo molecular en que NSP4 contribuye a dichos procesos aún no se conoce (Lopez et al, 2005; Silvestri et al, 2005).

Traducción

Para el inicio de la traducción en eucariotes, según el modelo clásico, se requiere del ensamblaje del complejo ternario eIF2*GTP*Met-tRNA_i con la subunidad pequeña del ribosoma (40S), resultando en la formación del complejo 43S. Las regiones no traducidas (UTR's, por sus siglas en inglés) 5' y 3' del mRNA son muy importantes, ya que posterior a la formación del complejo 43S se da la unión del complejo eIF4F (formado por eIF4E, eIF4G y eIF4A) al *cap* (mediante eIF4E), y a la proteína de unión a poli-A (mediante PABP, por sus siglas en inglés), respectivamente. Lo anterior permite la circularización del mRNA para que éste pueda ser escaneado en busca del codón de inicio (Kapp & Lorsch, 2004) (**Figura 2**).

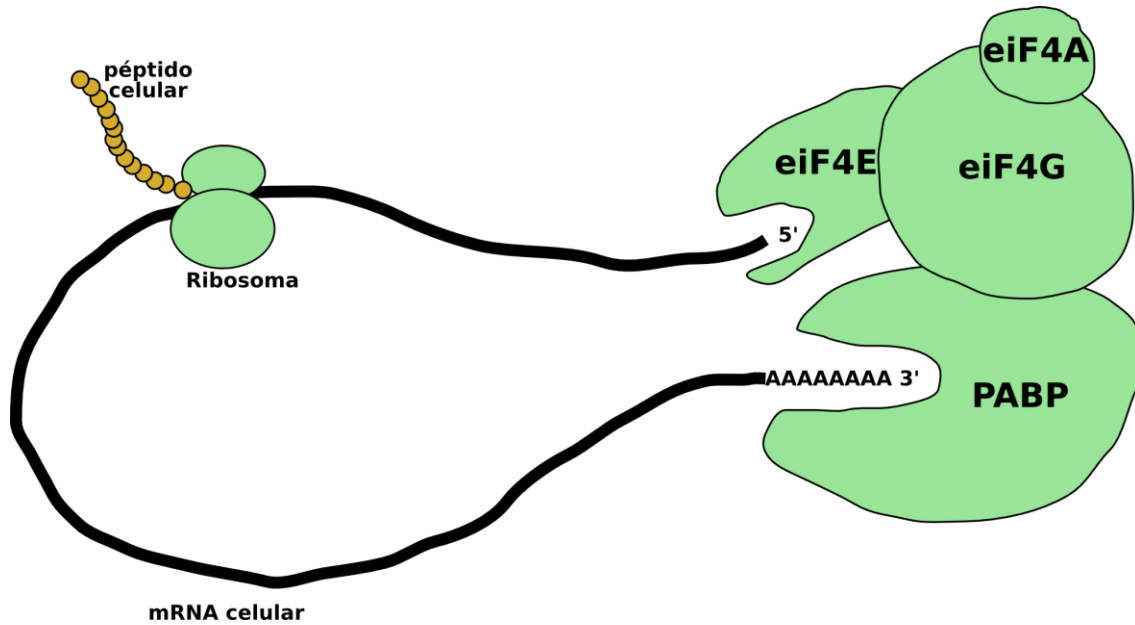


Figura 2. Modelo clásico de inicio de traducción en eucariontes. Esquema del modelo clásico de inicio de la traducción de proteínas en células eucariontes, en donde PABP interacciona con la secuencia poli-A presente en el 3'-UTR de los mRNA's celulares; y eIF4E interacciona con el *cap* situado en la región 5'-UTR de los mismos. Tanto eIF4E como PABP forman un complejo con las proteínas eIF4G y eIF4A (complejo eIF4F), para la circularización y el posterior escaneo por el ribosoma para encontrar el codón de inicio.

Como se mencionó anteriormente, en la familia *Reoviridae*, los mRNA's virales poseen UTR's 5' y 3' de longitud variable. En los rotavirus del grupo A, la secuencia consenso UGACC en el 3'-UTR está estrictamente conservada en los 11 genes virales. A diferencia de los mRNA's de rotavirus, la mayoría de los mRNA's celulares posee un extremo 3' poli-adenilado. Se ha visto que las secuencias poli-A están involucradas en la regulación de la traducción, estabilidad y degradación del mRNA, incluso se ha encontrado que los 3'-UTR's de los mRNA's celulares están involucrados en la localización celular de los mismos (Singer, 1996). Por analogía, se ha sugerido que la unión de NSP3 al 3'-UTR de los mRNA's virales está involucrada en su transporte y/o traducción (Poncet et al, 1993).

Interferencia del RNA

El silenciamiento de RNA o interferencia de RNA es un proceso en el que las células responden a la presencia de RNA de doble cadena (dsRNA, por sus siglas en inglés) en el citoplasma celular, usando una serie de enzimas para la degradación de este último; y se lleva a cabo de manera natural en una gran variedad de organismos eucariontes (Mello & Conte, 2004). Así, una de las funciones de este sistema es la de actuar como un mecanismo de defensa para contender contra una serie de situaciones, *e.g.* las infecciones virales, gracias a que muchos virus poseen moléculas de dsRNA como intermediarios de la replicación (Meister & Tuschl, 2004). El dsRNA es reconocido inicialmente por una enzima llamada Dicer, una endonucleasa que contiene los dominios de RNasa tipo III y de unión a dsRNA. Dicer se une al dsRNA y lo corta generando fragmentos de 21-22 nucleótidos, dichos fragmentos son conocidos como siRNA's. Los siRNA's generados por Dicer son reconocidos por el complejo RISC (del inglés *RNA-Induced Silencing Complex*), que es un complejo multiproteico con diferentes actividades, entre las que destacan la de RNasa y la de unión a siRNA's (**Figura 3**). Una vez que el siRNA se une a RISC, este último cataliza la disociación de la doble cadena del siRNA, manteniendo la unión sólo con la hebra de polaridad negativa, que posteriormente por complementariedad se unirá al RNA blanco. Este proceso culmina en la degradación de la secuencia blanco catalizada por uno de los dominios de RISC, un proceso dependiente de ATP (Novina & Sharp, 2004).

La interferencia de RNA ha resultado crucial en el estudio de la función génica. Sin embargo, los siRNA's como herramientas de estudio poseen ciertas desventajas, *e.g.* la función de los siRNA's se lleva a cabo sólo en una ventana de tiempo corta; o la eficiencia de transfección en algunos cultivos celulares puede ser muy baja. Es por eso que se han desarrollado herramientas que permiten la interferencia del RNA de manera más estable, y que aseguran la expresión del siRNA en la mayoría de la población, una de ellas es el uso de shRNA's (del inglés *short hairpin RNA's*).

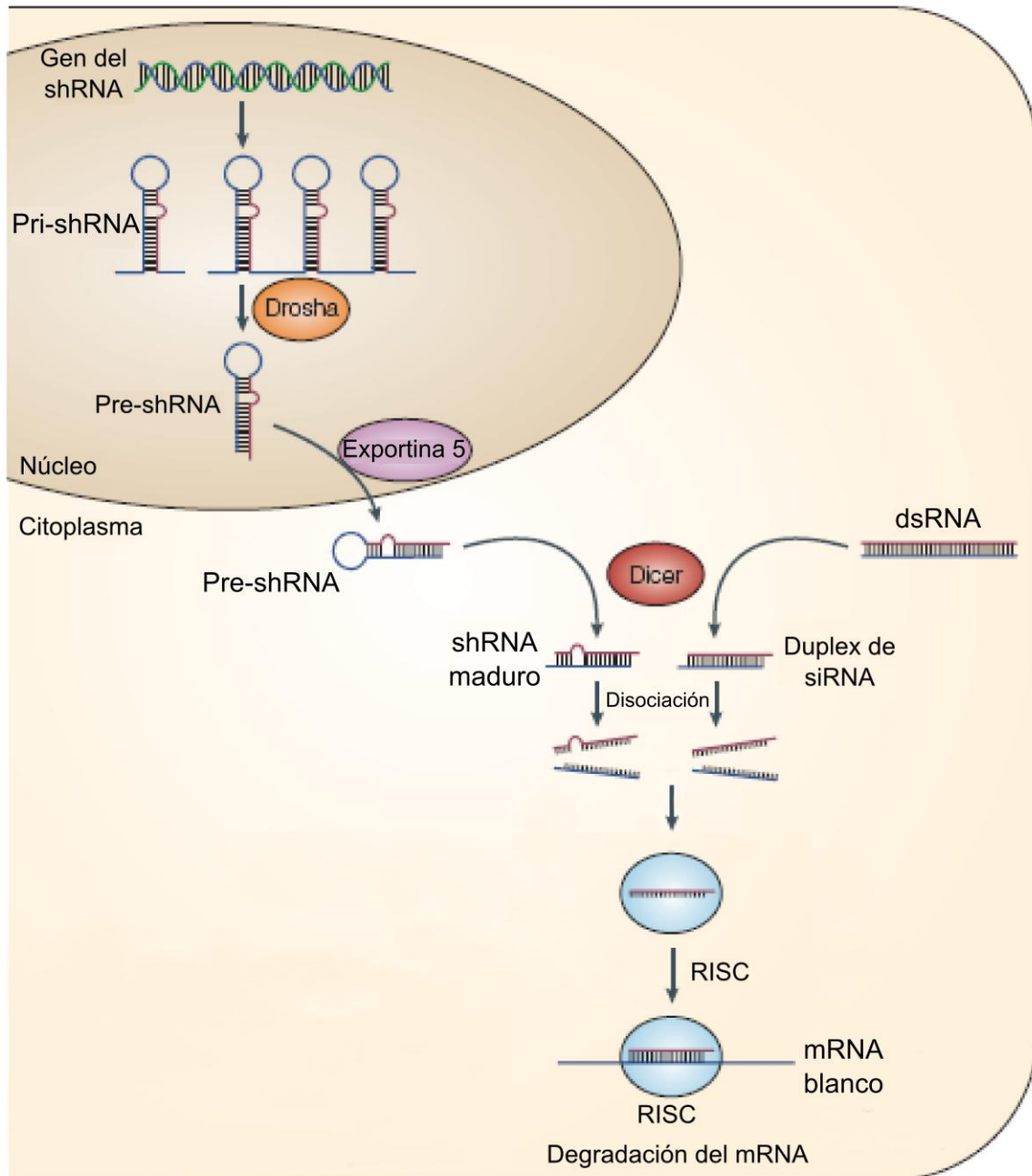


Figura 3. Biogénesis y procesamiento de siRNA's y shRNA's. Los pri-shRNA's son procesados por Drosha dentro del núcleo para dar lugar al pre-shRNA's. Los pre-shRNA's son transportados fuera del núcleo por Exportina 5 y procesados en el citoplasma por Dicer para dar lugar a los siRNA's. Dicer también es capaz de procesar moléculas grandes de dsRNA para formar siRNA's. Sólo una de las cadenas del shRNA o del dúplex de siRNA es ensamblada preferentemente en el complejo RISC, el cual a su vez actúa sobre su blanco degradándolo. *Modificado de (He & Hannon, 2004).*

A diferencia de los siRNA's, los shRNA's son sintetizados en el núcleo para posteriormente ser transportados al citoplasma e incorporarse al complejo RISC, de manera similar a la vía de maduración de los miRNA's (micro RNA's). Los shRNA's puede ser transcritos tanto por la RNA polimerasa tipo II como por la tipo III (Meister & Tuschl, 2004).

Para superar algunas de las limitaciones de los siRNA's, se han generado vectores con promotores para dichas polimerasas, que transcriben shRNA's y éstos funcionan como sustrato dentro de la célula para generar siRNA's. Los shRNA's son transcritos en el núcleo plegándose sobre sí mismos y formando una estructura de tallo-asa o pasador, denominada pri-shRNA. Los pri-shRNA's son procesados en el núcleo por Drosha, formando los pre-shRNA's, que aún poseen estructura de pasador. Los pre-shRNA's son reconocidos por un factor de exportación nuclear llamado Exportina 5, el cual los saca al citoplasma mediante un mecanismo dependiente de Ran-GTP (Lee et al, 2002; Rao et al, 2009). Ya en el citoplasma los pre-shRNA's son procesados por Dicer para dar lugar a los siRNA's (**Figura 3**). Los siRNA's generados por el procesamiento de los shRNA's, son posteriormente procesado por RISC de la misma forma que los siRNA's cuando son transfectados, culminando en la degradación de una secuencia blanco por RISC (**Figura 3**) (Rao et al, 2009).

ANTECEDENTES

La proteína no estructural NSP3 tiene una masa molecular de 36 kDa, posee un dominio de unión a RNA, que se une a la secuencia consenso UGACC en el 3'-UTR de los mRNA's virales, un dominio de dimerización y un dominio de interacción con eIF4G (**Figura 4**), por lo que se ha propuesto que NSP3 participa en la traducción de mRNA's virales (Deo et al, 2002; Piron et al, 1999).

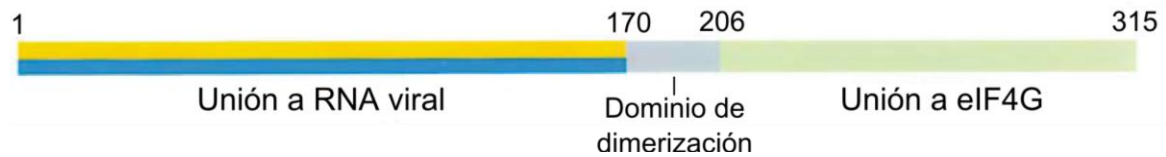


Figura 4. Esquema de la estructura primaria de la proteína NSP3 de rotavirus tipo A. El N-terminal de NSP3 posee un dominio que interactúa con la secuencia 3'-UTR's de los mRNA's virales. El C-terminal posee un dominio que interactúa con el factor eIF4G celular. *Modificado de (Deo et al, 2002)* .

En estos trabajos se ha sugerido que NSP3 cumpliría la función de PABP en la traducción de los mRNA's virales, ya que estos últimos carecen de poli-A; y que la interacción entre eIF4G con NSP3 se da a través de la misma región de unión a PABP, lo cual promovería el apagado de la síntesis de proteínas celulares al evitar la unión de PABP con eIF4G (Piron et al, 1998). Además, ya que NSP3 es capaz de unirse específicamente tanto a los mRNA's virales como a eIF4G, se ha sugerido que esta interacción permite la activación concertada de la traducción de dichos mRNA's, como ha sido propuesto por el grupo del Dr. Poncet (Desselberger & Gray, 2003). Sin embargo, en nuestro grupo se encontró que al silenciar la expresión de la proteína NSP3 mediante RNA's de interferencia (siRNA's), no se afectó la síntesis de las proteínas virales, pero la síntesis de proteínas celulares sí aumento, lo que sugiere que la función de esta proteína es diferente a la inicialmente propuesta (Montero et al, 2006). En este trabajo también se encontró que la síntesis de RNA viral, y la cantidad de virus infeccioso producido en las células en las que se silenció la expresión de NSP3, aumentaron hasta tres veces. Estos hallazgos nos hacen pensar que la unión de NSP3 a los mRNA's virales y a eIF4G es llevada a cabo por funciones independientes de los dominios de NSP3, *i.e.* el dominio de unión a RNA y el de unión a eIF4G no tienen una función

sinérgica en la traducción de los mRNA's virales; y que la unión de NSP3 a mRNA's virales podría estar involucrada en otras funciones, *e.g.* en la localización de los mismos en el citoplasma celular.

Es importante mencionar que los ensayos que sugieren que NSP3 participa en la traducción de mRNA's virales, sólo han sido realizados *in vitro* o en células que expresan constitutivamente NSP3 (Keryer-Bibens et al, 2009; Vende et al, 2000), pero nunca se han realizado en el contexto de células infectadas por rotavirus. Es por ésto, que resulta importante definir la función de NSP3 en la traducción de mRNA's virales durante la infección por rotavirus, *i.e.* en presencia de todas las proteínas virales.

También es importante señalar que en los ensayos de silenciamiento mediante siRNA's, existe un porcentaje de células no transfectadas, que podría oscurecer el resultado del silenciamiento. Es por eso que en este proyecto nos propusimos obtener una línea celular que expresara de manera estable un shRNA dirigido contra NSP3.

HIPÓTESIS

La obtención de una línea celular que exprese de manera estable un shRNA dirigido contra la proteína NSP3 de RRV, permitirá inhibir la expresión de esta proteína durante la infección por rotavirus.

OBJETIVO GENERAL

En este trabajo proponemos la obtención de una línea celular, que inhiba la expresión de la proteína viral NSP3 mediante la expresión estable de un shRNA, para ser usada como herramienta en el estudio de dicha proteína viral.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Generar los vectores con el shRNA que se utilizarán para la obtención de la línea celular.
2. Establecer las condiciones de selección de dicha línea celular.
3. Transfectar y seleccionar la línea celular.
4. Comprobar la presencia del shRNA en dicha línea.
5. Evaluar la expresión de la proteína blanco en la línea celular seleccionada.
6. Evaluar la expresión de la proteína blanco en dicha línea, en el contexto de una infección viral.

MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas celulares

En el estudio de la cepa RRV de rotavirus, la línea celular modelo en la que se estudian los efectos de la infección es la línea MA104, derivada de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*). Estas células tienen una morfología epitelial (revisado en la *American Type Culture Collection*), y es la que rutinariamente usamos en el laboratorio. Sin embargo, debido a que se ha observado que estas células son resistentes a diversos antibióticos, y además son poco transfectables (datos del laboratorio), en este trabajo se decidió usar la línea COS7, debido a que en la selección de nuestra línea se usa puromicina. La línea COS7 también proviene de riñón de mono verde africano, por lo que presenta ciertas características en común con las células MA104 (Gluzman, 1981); sin embargo en COS7 la morfología es más parecida a un fibroblasto (revisado en la *ATCC*), en esta línea no se ha observado tal resistencia a antibióticos y son más fácilmente transfectables que la línea celular MA104.

Existen algunos reportes que usan la línea celular COS7 como modelo para la infección de la cepa RRV de rotavirus, debido a su capacidad de transfección (Sen et al, 2009). Dicha línea celular también se ha usado para estudiar otras cepas de rotavirus, como SA11, RF, entre otras (Arias et al, 1996).

Producción de lisados virales (para frascos F-75)

Se cultivaron células MA104 en medio MEM con 4% de SFB a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂, hasta alcanzar la confluencia. Posteriormente se lavó la monocapa con MEM sin suero y se infectó con el virus RRV (previamente activado con 10 µg/ml tripsina a 37°C durante 30 minutos) en 2 ml de medio y se dejó adsorbiendo durante 1 hora a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. Posteriormente se lavó la monocapa una vez más con MEM sin suero y se dejó incubando en 8 ml de MEM sin suero durante 16-18 horas. Una vez que se

observó el efecto citopático se usó una espátula para raspar la monocapa, y posteriormente se colectó en tubos eppendorf.

Titulación del lisado viral por el método de inmunoperoxidasa (cajas de 96 pozos)

Se cultivaron células MA104 en medio MEM con 4% de SFB a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂, hasta alcanzar confluencia en todos los pozos. Posteriormente se lavó la monocapa celular con 100 µl/pozo de MEM sin suero y se infectó con 50 µl/pozo de diluciones seriadas 1:2 del virus RRV activado. Se dejó adsorbiendo por 1 hora a 37°C y 5% de CO₂, y posteriormente se lavó la monocapa celular con 100 µl/pozo de MEM sin suero. Se dejó incubando durante 14-16 horas a 37°C y 5% de CO₂.

Tinción por inmunoperoxidasa (cajas de 96 pozos)

Una vez transcurrido el tiempo de infección de 14-16 horas se retiró el medio y se incubaron durante 30 minutos las células con acetona al 80% (diluída en PBS), para fijarlas a las cajas de 96 pozos. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS y se incubó con 50 µl/pozo del anticuerpo primario α -TLP's (dilución 1:3000) durante 1 hora a 37°C. Se retiró el anticuerpo y se lavó de nuevo 3 veces, se incubó con 50 µl/pozo de Proteína A-Peroxidasa (dilución 1:3000) durante 1 hora a 37°C. Posteriormente se adicionó el sustrato de la Peroxidasa y se incubó a temperatura ambiente hasta que aparecieron células de color marrón (infectadas). Se lavó la placa con agua y se dejó secar, para posteriormente contar focos infecciosos (UFF's).

Cálculo de Unidades Formadoras de Focos (UFF)

Para el cálculo de las unidades formadoras de focos se contaron 9 campos al azar por pozo, haciendo uso de microscopía de campo claro. Posteriormente se multiplicó el promedio de las células infectadas por pozo por el factor del área de cada pozo, *i.e.* por 9.5 para cajas de 96 pozos. Posteriormente se multiplicó el resultado de la operación anterior por la dilución

seriada del pozo en el que se contó. Finalmente se multiplicó por un factor de corrección por mililitro calculado en el laboratorio, que en este caso es de 20.

Transfección de plásmidos (cajas de 48 pozos)

Se cultivaron las líneas celulares en medio MEM con 4% de SFB a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂, hasta alcanzar confluencia. Posteriormente se transfectaron las diferentes construcciones usando *Lipofectamine LTX (Invitrogen)*, siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. De la construcción pcDNA3.1-N3 se transfectaron 400 ng/pozo, y para todas las demás construcciones utilizadas en el presente trabajo se transfectaron 200 ng/pozo.

Determinación de la densidad celular

Para determinar la densidad celular es necesario tomar en cuenta el método de transfección, y a qué densidad se encontrarán las células una vez se haya concluido la transfección. Debido a que se usó *Lipofectamine LTX (Invitrogen)* como método de transfección, se decidió fijar la densidad celular en 100%, ya que primero se sembraron las cajas de 48 pozos, se dejaron crecer 48 horas hasta alcanzar una densidad celular de 95-100% y posteriormente se transfectaron, se incubaron 5 horas con el medio de transfección y después se cambió el medio por MEM 2% SFB. A las 24 horas de haber cambiado el medio, se colocó DMEM 10% SFB con la concentración crítica determinada (**Figura 10**).

Determinación de la concentración crítica de puromicina

Para determinar la concentración crítica de este antibiótico se hizo una serie de diluciones 1:2 de puromicina en DMEM 10% SFB (desde 10 µg/ml hasta 75 ng/ml), y se usaron células sin tratar como control (**Figura 5**). Se observó que la concentración óptima que provocaba muerte celular masiva a los 3-5 días, y muerte de todas las células en el pozo a las 2 semanas del tratamiento, fue la de 5 µg/ml para células 100% confluentes, así que ésta

fue la concentración usada para seleccionar la línea celular en COS7 que expresa establemente el shRNA.

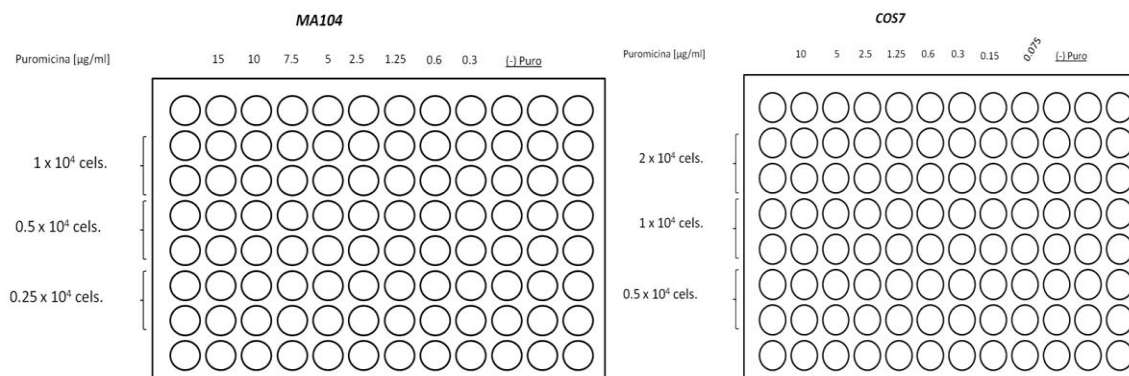


Figura 5. Diseño experimental usado para determinar la concentración crítica de puromicina. Se hicieron diluciones 1:2 seriadas de puromicina, comenzando con 15 $\mu\text{g/ml}$ para MA104 y 10 $\mu\text{g/ml}$ para COS7, y terminando en 300 ng/ml y 75 ng/ml, respectivamente. Se probaron diferentes densidades celulares, a pesar de haber usado el 100% de confluencia, y se determinó que a mayor confluencia mayor es la cantidad de antibiótico requerida para provocar muerte.

En la compañía *Ambion* (de donde se obtuvo este protocolo) definen la concentración crítica de antibiótico como la concentración que provoca muerte celular masiva a los 3-5 días, y muerte celular en toda la placa a los 15 días. En las células COS7 se determinó una concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$ en células 100% confluentes; en células MA104 se determinó una concentración alrededor de 10 veces superior a la de COS7.

Evaluación de las líneas celulares en presencia del virus

La línea celular fue transfectada con el plásmido deseado, posteriormente se cambió el medio por MEM 2% SFB y a las 38 horas post-transfección se infectó durante 9 horas, de modo que se cosecharon las células a las 48 horas post-transfección (**Figura 6**).

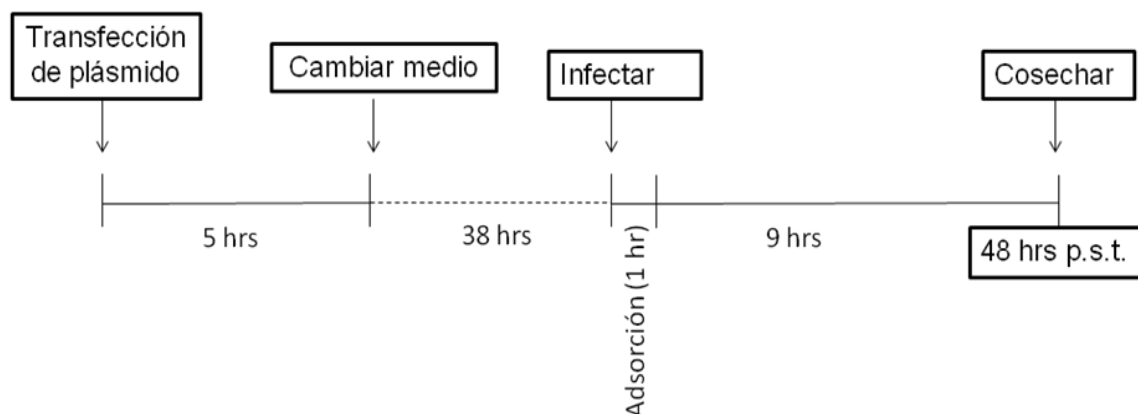


Figura 6. Diseño experimental usado para evaluar el efecto de la transfección en ambas líneas celulares. Una vez transfectado el plásmido se cambió el medio por MEM 2% SFB y 38 hrs después se infectó durante 9 hrs. Se cosechó 48 hrs después de cambiar el medio. El virus se dejó adsorbiendo durante 1 hora a 37°C y a una atmósfera de 5% CO₂.

Purificación de plásmidos

Para la purificación de plásmidos se utilizaron los kits *High Pure Plasmid Isolation Kit* de Roche (No. de cat. 11 754 785 001) y el *Plasmid Midi Kit* de QIAGEN (No. de cat. 12243), siguiendo las instrucciones de los respectivos fabricantes.

Secuenciación de plásmidos

Todos los vectores construidos en este trabajo se secuenciaron en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del IBt-UNAM, donde se usa el método de secuenciación *Taq FS Dye-Terminator*, y el equipo *Perkin Elmer/Applied Biosystems Modelo 3730*.

Síntesis de oligonucleótidos

La Unidad de Síntesis y Secuenciación del IBt-UNAM sintetizó todos los oligonucleótidos que se utilizaron en este proyecto, usando el método de fosfito-triéster en fase sólida, por lo que nuestros oligonucleótidos sintetizados no tienen grupo fosfato en el extremo 5'.

Purificación de oligonucleótidos

Todos los oligonucleótidos se purificaron usando el protocolo recomendado por la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del IBt-UNAM (<http://www.ibt.unam.mx/sintesis/page.html>). Los oligonucleótidos se corrieron en un gel al 15% de acrilamida y 7 M de urea, en presencia de un colorante de DNA. Posteriormente se cortaron las bandas específicas y se purificaron los oligonucleótidos por precipitación con n-Butanol, como indica el protocolo de la Unidad de Síntesis IBt-UNAM.

Hibridación de oligonucleótidos precursores del shRNA

Para la hibridación de los oligonucleótidos precursores de los shRNA's se siguió el protocolo recomendado por el fabricante (*Ambion* No. de cat. AM5775). Sin embargo, también se probó el mismo protocolo de hibridación pero usando otro *Buffer*, incubando 500 ng de cada uno de los oligonucleótidos en Buffer NEB 3 y en un volumen total de 25 μ l.

Ligación del inserto al vector pSilencer 4.1-CMV Puro

Para la ligación de los precursores de los shRNA's al vector pSilencer 4.1-CMV Puro, se utilizó el protocolo recomendado por el fabricante (*Ambion* No. de cat. AM5775). Sin embargo, las ligaciones se purificaron por el método de fenol-cloroformo y se transformaron por electroporación en la cepa JM101 de *E. coli* (Smith & Jessee, 1990).

Se verificó que las ligaciones fueran las correctas mediante un PCR de colonia, y utilizando los oligonucleótidos recomendados para amplificar el inserto por el fabricante (*Ambion*), se obtuvieron bandas de alrededor de 247 nt's (**Figura 9**) como se esperaba.

PCR de colonia

Para el PCR de colonia se preparó una mezcla de reacción (por tubo) de la siguiente forma:

Buffer Thermopol	1.0 μ l
dNTP's	0.4 μ l del <i>stock</i> 5 mM (0.2 μ M final)
Oligonucleótido sentido	0.4 μ l (40 pmoles finales)
Oligonucleótido antisentido	0.4 μ l (40 pmoles finales)
Taq polimerasa	0.1 μ l (0.5 unidades)
H ₂ O	c.b.p 10 μ l

En condiciones de esterilidad se picó una colonia de las bacterias con el plásmido deseado, utilizando una punta de pipeta eppendorf, y se resuspendió dicha punta conteniendo la colonia en un tubo de reacción, e inmediatamente después se depositó en un tubo de ensayo con 3 ml de medio LB más el antibiótico de selección. Las colonias depositadas en los tubos de ensayo se incubaron a 37°C con agitación, y los tubos de PCR fueron sometidos al siguiente programa de PCR.

T ₁ = 94°C	3 minutos
T ₂ = 94°C	30 segundos
T ₃ = 60°C	1 minuto
T ₄ = 72°C	30 segundos
GO TO 2	rep 40
T ₆ = 72°C	10 min
Hold 4°C	

Como puede verse en la **Figura 9**, en los controles del vector sin inserto (carriles 2 y 3), a diferencia de lo que se esperaba, sí se obtuvo un inserto de alrededor de 900 pb, el cual contrasta con el inserto de 247 pb que se obtuvo de las construcciones con el shRNA de NSP3 y GFP. Las clonas con los insertos de 900 pb también se mandaron a secuenciar, y sorprendentemente se encontró que contenían insertado un fragmento del gen de RAD51 en

el supuesto vector sin inserto. Creemos que ésto puede ser una estrategia del fabricante para evitar la amplificación del vector sin inserto.

Extracción de DNA celular

El DNA de las líneas celulares generadas en este trabajo se extrajo usando el método de TRIzol, siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante (TRIzol® Reagent, Invitrogen).

PCR para amplificar el shRNA

Para amplificar el shRNA a partir de las líneas celulares generadas en este trabajo, se siguió el mismo protocolo que para el PCR de colonia, usando los mismos oligonucleótidos y enzimas, pero se sustituyó la colonia bacteriana por el DNA celular purificado de cada una de las líneas.

RESULTADOS

Infección de COS7 por RRV

Para probar que la cepa RRV de rotavirus era capaz de inhibir la síntesis de proteínas en la línea celular COS7, de manera similar a como lo hace con la línea MA104, donde apaga la síntesis de proteína celular casi por completo a las 9 horas (Montero et al, 2006), se infectaron las células COS7 con RRV a una multiplicidad de infección (M.O.I, por sus siglas en inglés) de 5, durante diferentes tiempos. Posteriormente se marcó metabólicamente durante 30 minutos antes de cosechar, usando Metionina marcada con un isótopo de azufre (S^{35}), y se analizó la expresión de proteínas virales por autoradiografía (Figura 7).

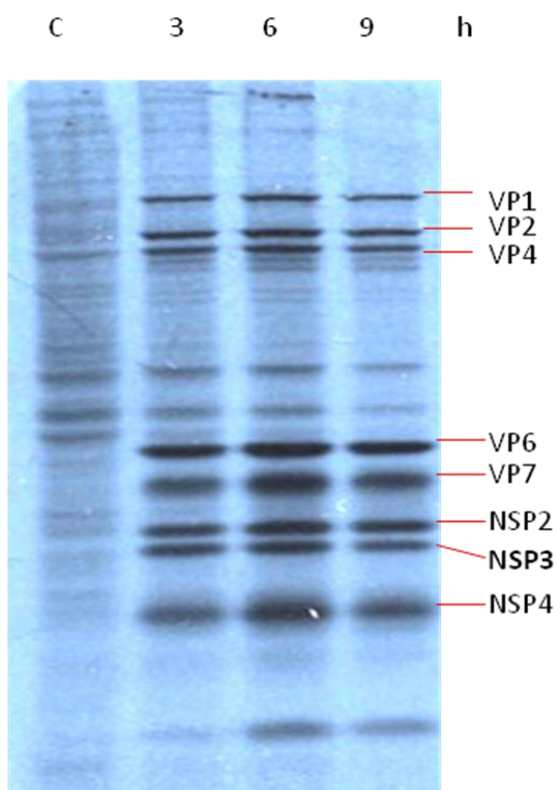


Figura 7. Cinética de infección de RRV en COS7. Autoradiografía de células COS7 infectadas con RRV y cosechadas a las 3, 6 y 9 horas p.i. Como control se usó un lisado de células COS7 no infectadas. La marca radioactiva se incubó durante 30 min. antes de cosechar. Pueden observarse proteínas estructurales (VP's) y no estructurales (NSP's) de rotavirus, y una disminución en la síntesis de proteína celular a medida que avanza la infección.

Se observó una disminución en la síntesis de proteínas celulares (**Figura 7**), de igual forma que ocurre en las células MA104 infectadas. Incluso, puede observarse un ligero aumento en el nivel de expresión de proteínas virales a las 6 horas, al igual que ocurre con la línea MA104 (Montero et al, 2006). Por lo tanto, RRV es capaz de infectar a la línea COS7 de manera similar a como lo hace con el modelo convencional (MA104), y puede ser usada como modelo de estudio para esta cepa.

También se determinó la cantidad de partículas infecciosas tanto en COS7 como en MA104, y se encontró que el título viral en COS7 es de aproximadamente 2 órdenes de magnitud menor al que se obtiene en MA104 (**Tabla 1**), como ya ha sido reportado en otros trabajos (Taraporewala et al, 2002), es por eso que MA104 se siguió utilizando para crecer y purificar al virus.

Tabla I. Comparación de títulos virales entre células MA104 y COS7.

<i>Línea celular</i>	<i>Título viral</i>
MA104	4×10^8 UFF/ml
COS7	2.5×10^6 UFF/ml

Se observa una diferencia de alrededor de 2 órdenes de magnitud en los títulos entre una línea y la otra.

*UFF = Unidades Formadoras de Foco

Construcción del vector que codifica para el shRNA

Se construyeron dos vectores de expresión de shRNA's, el primero codifica para un shRNA contra NSP3, y el segundo para un shRNA dirigido contra GFP para ser usado como control. Dichas construcciones se realizaron en el vector pSilencer 4.1-CMV Puro de *Ambion* (AM5775), usando una variación del protocolo proporcionado por el fabricante.

Inicialmente se diseñaron los insertos que codifican para los shRNA's (**Figura 8**). Para el shRNA de NSP3 se usaron las secuencias sentido (*AAU UGG AUG ACU GAC UCU CGA*) y antisentido (*UCG AGA GUC AGU CAU CCA AUU*), que ya han sido usadas anteriormente por la Dra. Hilda Montero (Montero et al, 2006) para el diseño de siRNA's, y

que hibridan del nucleótido 281 al 301 del gene de NSP3 del rotavirus cepa RRV (GenBank: HQ846849.1). Para el shRNA de GFP se utilizaron las secuencias sentido (*AAC UUA CCC UGA AGU UCA UCU*) y antisentido (*AGA UGA ACU UCA GGG UAA GUU*), usadas anteriormente por el Dr. Tomás López (Lopez et al, 2005), que hibridan del nucleótido 126 al 146 del gene de GFP (GenBank: AB594822.1). En ambos casos se usó la secuencia *loop* (*UUC AAG AGA*) sugerida por el fabricante (Ambion® No. de cat. AM5775).

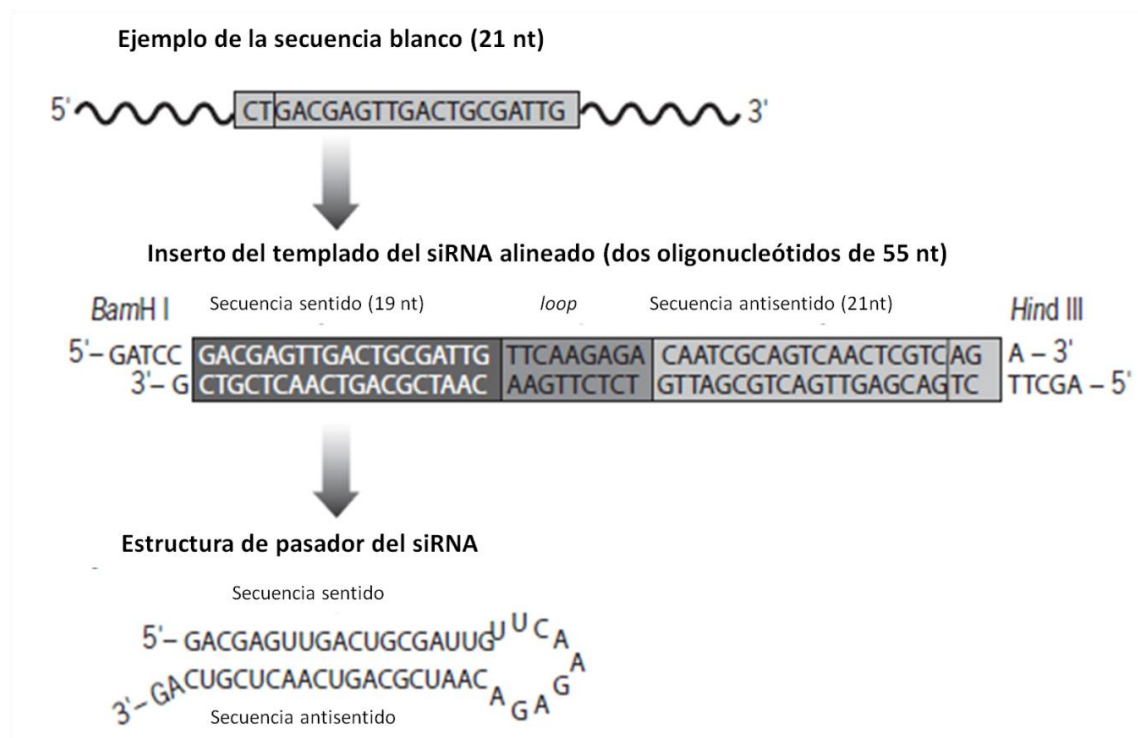


Figura 8. Diseño del shRNA que se clonó en pSilencer 4.1-CMV Puro. Se seleccionaron las secuencias sentido y antisentido contra los genes deseados, previamente utilizadas en el laboratorio (Lopez et al, 2005; Montero et al, 2006), y una secuencia *loop* recomendada por el fabricante. Los sitios de *Bam* HI y *Hind* III flanquean la secuencia que se clonó en el vector pSilencer 4.1-CMV Puro.

También se diseñó la cadena complementaria de cada uno, dejando algunos nucleótidos desapareados en los extremos (**Figura 8**), de modo que los oligonucleótidos quedaron como lo indica la **Tabla 2**, donde el oligonucleótido 1 es complementario casi por completo al oligonucleótido 2, excepto en los extremos(**Figura 8**).

Tabla II. Secuencias de los oligómeros que forman los shRNA's.

<i>Oligo</i>	<i>Secuencia (55 nt's) 5'→3'</i>
shNSP3-1	<i>gatcc</i> TTGGATGACTGACTCTCGATT <u>TTCAAGAGAT</u> CGAGAGTCAGTCATCCAAT <i>Ta</i>
shNSP3-2	<i>agctt</i> AATTGGATGACTGACTCTCGAT <u>TCTCTTGAAT</u> CGAGAGTCAGTCATCCA <i>ag</i>
shGFP-1	<i>gatcc</i> CTTACCCTGAAGTTCATCT <u>TTCAAGAGA</u> AGATGAACTTCAGGGTAAGT <i>Ta</i>
shGFP-2	<i>agctt</i> AACTTACCCTGAAGTTCATCT <u>TCTCTTGA</u> AAGATGAACTTCAGGGTAAG <i>Gg</i>

En minúsculas negritas (extremos) se muestran los sitios de corte de las enzimas *Bam* HI y *Hind* III. En mayúsculas subrayadas se encuentra la secuencia que formará el *loop* del shRNA. Ver **Figura 8**.

Una vez sintetizados los oligonucleótidos, se hibridaron y se ligaron al vector pSilencer 4.1-CMV Puro, como se indica en *Materiales y Métodos*. Posterior a la ligación se transformó en *E. Coli JM101* y se seleccionaron las clonas positivas por PCR de colonia, en dónde todas las variaciones del protocolo escogidas dieron clonas positivas (**Figura 9**). Por secuenciación se corroboró que las construcciones eran las deseadas (ver **Figura 11**).

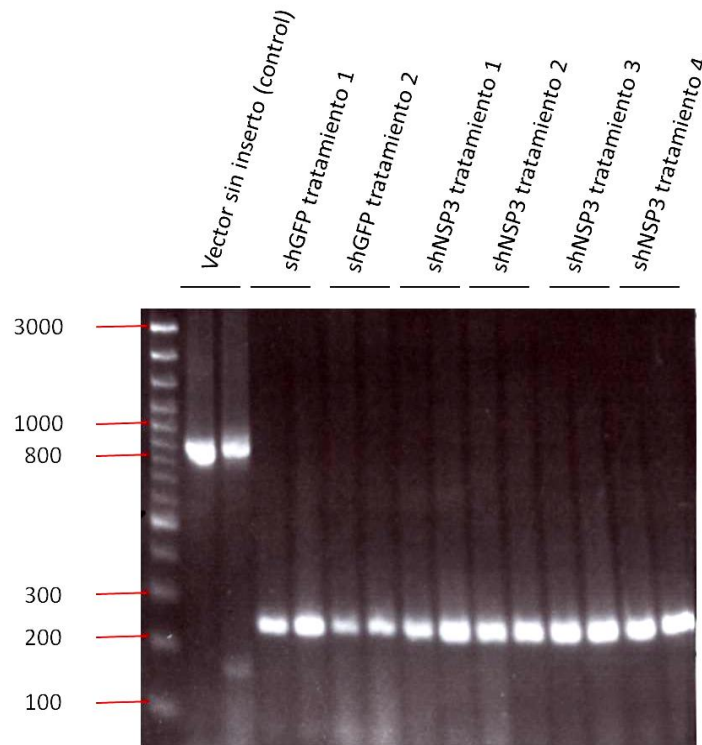


Figura 9. PCR de colonia de bacterias con las diferentes construcciones. Los carriles 6, 7 (shGFP tratamiento 2), 13 y 14 (shNSP3tratamiento 4) son los productos de los insertos que se hibridaron con la solución de alineamiento original del *kit* del pSilencer 4.1-CMV. En el vector sin inserto (control) aparece una banda de alrededor de 900 pb, como se discute en *Materiales y Métodos*.

Determinación de la concentración crítica de puromicina y de la densidad celular óptima

Es necesario determinar la densidad celular óptima para el tratamiento con puromicina, ya que la concentración de antibiótico requerida para la selección varía según la densidad celular, generalmente se requieren concentraciones más altas de antibióticos a mayor densidad celular. Dado que el protocolo de transfección utiliza Lipofectamina LTX, la densidad celular se fijó en 100%, como se describe en *Materiales y Métodos*.

Para determinar la concentración crítica de puromicina que provoca muerte celular masiva a los 3-5 días, y causa muerte celular en toda la placa a los 15 días, que según el protocolo del fabricante, es el criterio para determinar la concentración crítica a utilizar en la selección de la línea celular, se hizo una dilución de diferentes concentraciones de puromicina en cajas de 48 pozos, como se describe en *Materiales y Métodos*.

Se observó que la concentración crítica de puromicina en células COS7 a una densidad del 100% es de 5 µg/ml, que como ya se mencionó, es la que se usó una vez transfectado el pSilencer 4.1-CMV/shRNA en las células. Como ya se había contemplado, la concentración crítica de puromicina en la línea MA104 resultó ser de alrededor de 10 veces más alta que en la línea COS7 (datos no mostrados).

Transfección de COS7 con pSilencer y selección de la línea que expresa el shRNA

Se transfectaron los plásmidos con las construcciones pSilencer 4.1-CMV Puro/shNSP3 y pSilencer 4.1-CMV Puro/shGFP en células COS7 por separado, usando Lipofectamina LTX mediante el protocolo implementado, como se describe en *Materiales y Métodos*. Una vez transfectadas las células, éstas se sometieron a selección en MEM 5%SFB con 5 µg/ml de puromicina. El diseño experimental se muestra en la **Figura 10**, una vez agregada la puromicina el medio con dicho antibiótico se cambió cada 3 días. Quince días post-transfección las células se siguieron subcultivando como cualquier línea celular, pero siempre en presencia de 5 µg/ml de puromicina.

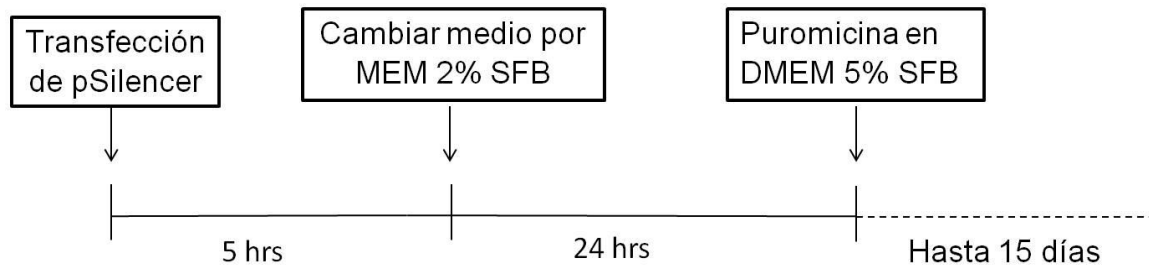


Figura 10 . Estrategia metodológica para generar la línea celular estable. Se transfectaron los vectores pSilencer 4.1-CMV Puro/shGFP y pSilencer 4.1-CMV Puro/shNSP3, por separado, en diferentes poblaciones de COS7. Se incubaron las células transfectadas con 2% de SFB durante 24 hrs. y se trataron con el antibiótico de selección hasta observar muerte celular masiva.

Después de 5 pases en MEM 5% SFB con 5 μ g/ml de puromicina, las líneas celulares (llamadas COS7-shNSP3 y COS7-shGFP) se recuperaron por completo, y se usaron para evaluar la función de los shRNA's.

Evaluación del shRNA en las líneas celulares

Para evaluar que las líneas celulares COS7-shNSP3 y COS7-shGFP tuvieran el inserto (shNSP3 y shGPF respectivamente), y no hubiera contaminación cruzada del shRNA en dichas líneas, debido a que se trabajaron al mismo tiempo, se realizó un PCR a partir del DNA purificado de cada una de las líneas celulares. Como puede observarse en el fragmento del mapa del pSilencer 4.1-CMV Puro (**Figura 11**), se espera un producto de PCR de 247 pb.

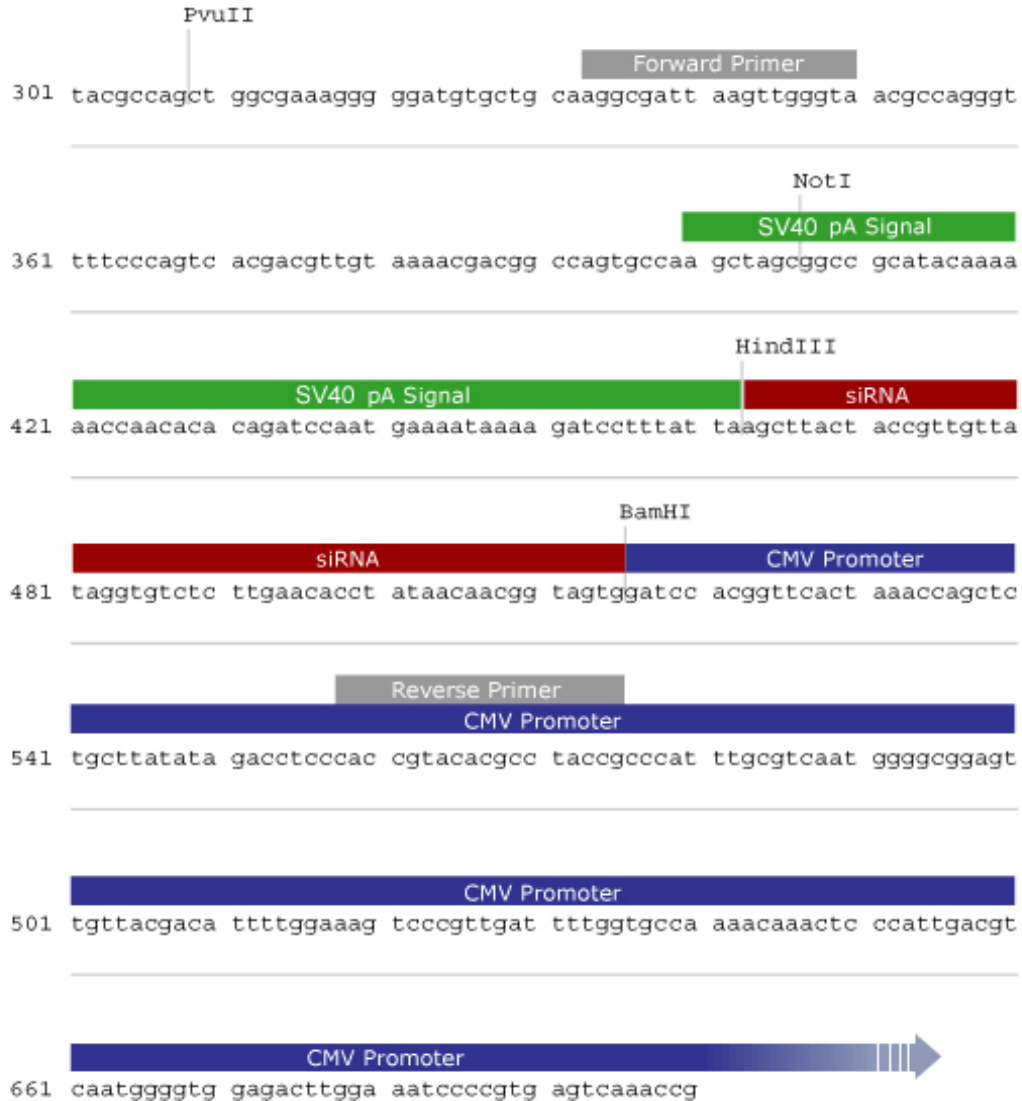


Figura 11. Segmento del mapa de pSilencer 4.1-CMV Puro. Pueden apreciarse los sitios de unión de los oligonucleótidos usados para amplificar el inserto (*forward* y *reverse primers*). Nótese que *Hind* III y *Bam* HI flanquean al shRNA clonado. El vector pSilencer 4.1-CMV Puro utiliza el promotor de Citomegalovirus (CMV) modificado para dirigir la expresión por la RNA polimerasa II, e incluye la señal de poliadenilación de SV40 río abajo del templado del shRNA, para terminar la transcripción.

Como puede verse en la **Figura 12**, en todas las líneas celulares generadas se obtuvo el inserto esperado, comparado con los controles positivos, que son los productos de PCR de los vectores purificados con los que se generaron las líneas COS7-shGFP y COS7-shNSP3.

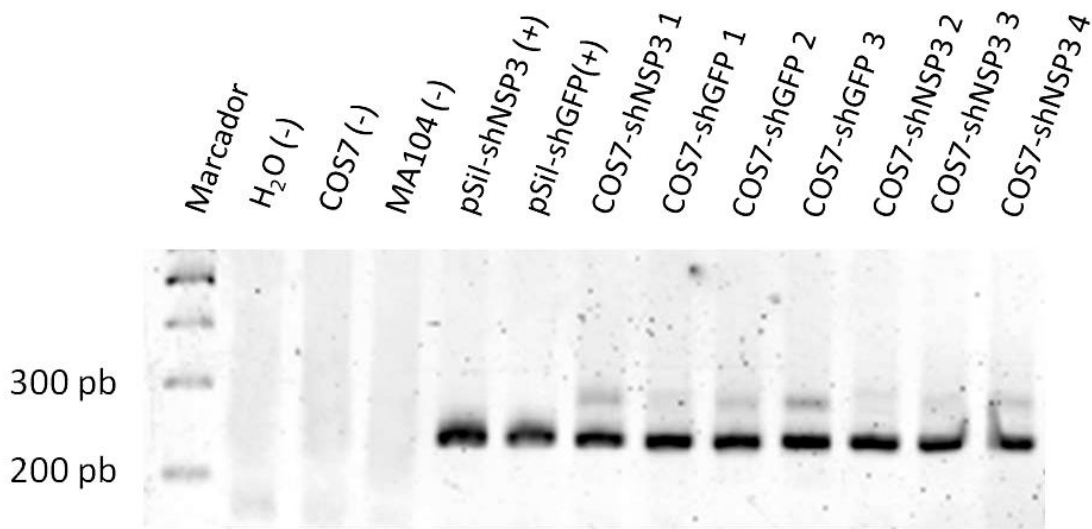


Figura 12. PCR del DNA purificado de las líneas celulares. Como control negativo se hizo un PCR a partir del DNA de COS7 y MA104; y como control positivo un PCR a partir de los vectores purificados (pSilencer-shNSP3 y pSilencer-shGFP, respectivamente). Los números finales en cada línea son líneas celulares independientes, *i.e.* líneas celulares provenientes de diferentes experimentos.

Una vez que se comprobó que ambas líneas celulares poseían el inserto, se realizaron diferentes digestiones para probar la identidad del shRNA en cada línea. Como puede observarse en las **Figuras 13** y **14**, ambos productos de PCR de 247 pb poseen en común un sitio para *Bam* HI, y un sitio que los diferencia: *Sty* I, por lo que se decidió usar estas enzimas para determinar la identidad de los insertos en las líneas celulares generadas.

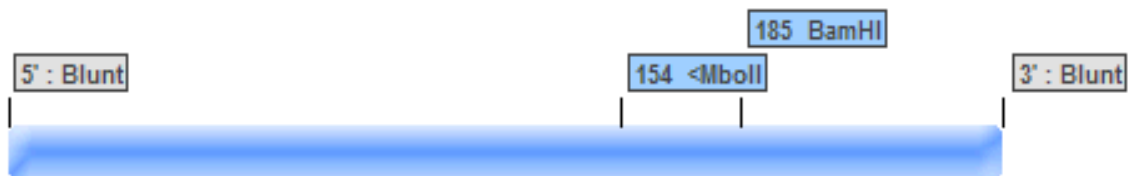


Figura 13. Diagrama de restricción del fragmento de 247 pb amplificado por PCR de la línea celular COS7-shGFP. Se muestran los sitios de restricción únicos que posee el templado del shRNA contra GFP, clonado en el vector pSilencer 4.1-CMV Puro.

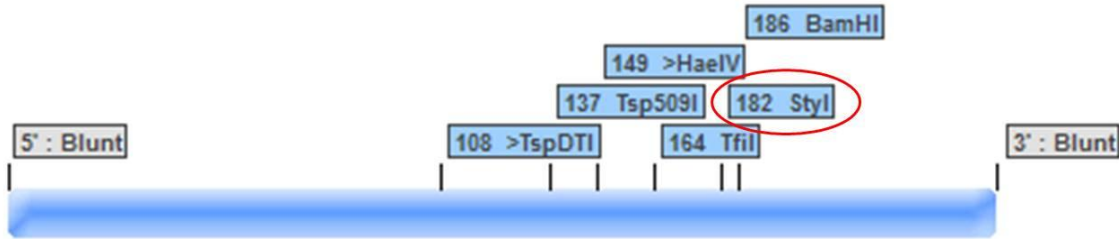


Figura 14. Diagrama de restricción del fragmento de 248 pb amplificado por PCR de la línea celular COS7-shNSP3. Se muestran los sitios de restricción únicos que posee el templado del shRNA contra NSP3, clonado en el vector pSilencer 4.1-CMV Puro. Nótese que sólo este fragmento posee el sitio *Sty* I, y por lo tanto se usó para determinar la identidad de cada inserto.

Para probar la identidad del shRNA proveniente del pSilencer se realizó una digestión con *Bam* HI de los productos de PCR de cada línea, en ambos casos se obtuvieron las bandas deseadas, de alrededor de 185 pb y 61 pb, como se muestra en la **Figura 15**.

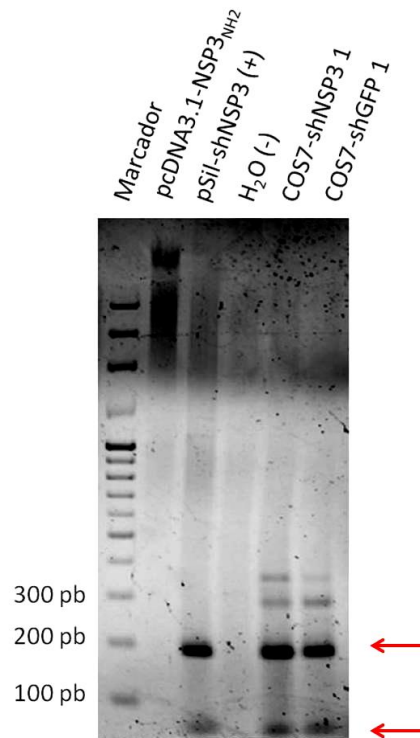


Figura 15. Digestión del producto de PCR con *Bam* HI. Se utilizó el producto de PCR del vector purificado pSilencer 4.1-CMV Puro/shNSP3 como control positivo de la digestión, y H₂O como control negativo. Las bandas tenues que se observan arriba de los productos de digestión, en los carriles 5 y 6, probablemente se tratan del producto de PCR que no se digirió por completo.

Para probar que el fragmento proveniente de las COS7-shGFP fuera el shRNA contra GFP y el proveniente de las COS7-shNSP3 el dirigido contra NSP3, se hizo una digestión con *Sty* I de los productos de PCR usados anteriormente, y como se esperaba, sólo el producto proveniente de la línea COS7-shNSP3 fue digerido en fragmentos de alrededor de 182 pb y 66 pb, de igual forma que el control positivo (**Figura 16**).

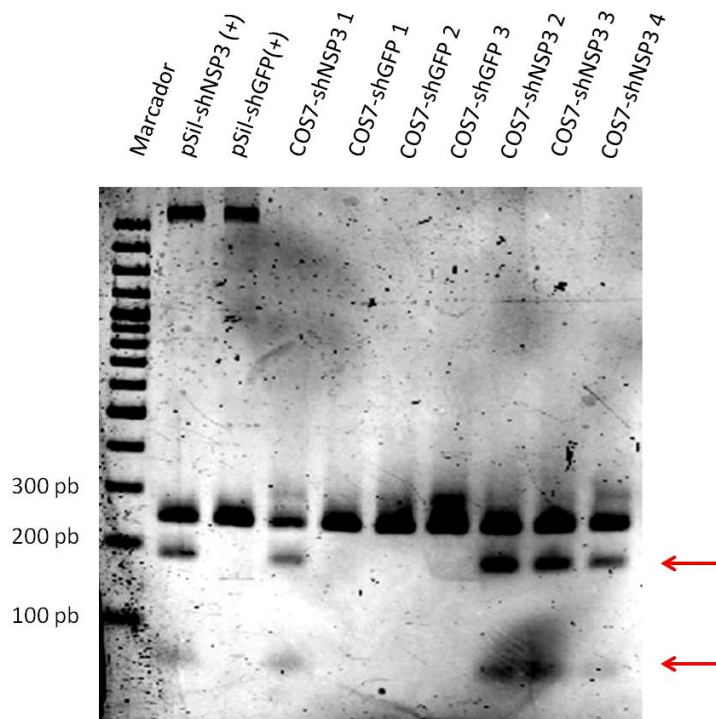


Figura 16. Digestión del producto de PCR con *Sty* I. Se utilizó como control positivo el producto de PCR del vector pSilencer 4.1-CMV Puro/shNSP3; y como control negativo el producto de PCR del vector pSilencer 4.1-CMV Puro/shGFP. Nótese que la digestión fue parcial, probablemente debido a las altas cantidades de producto de PCR usadas. Los números en cada una de las líneas usadas representan un experimento de selección independiente.

Estos resultados nos permitieron corroborar que las líneas celulares seleccionadas contienen en su genoma los shRNA's contra GFP y NSP3, respectivamente. Se decidió usar las líneas COS7-shNSP3(1) y COS7-shGFP(1) (**Figura 16**) para los siguientes experimentos, a las que llamamos COS7-shNSP3 y COS7-shGFP, sin los números finales.

Evaluación de la línea COS7-shGFP

Una vez confirmada la presencia e identidad del inserto en cada línea, se evaluó la expresión de la proteína contra la que está dirigido cada shRNA, en este caso se probó que la línea COS7-shGFP inhibiera la expresión de GFP. Para esto, la línea COS7-GFP fue transfectada con 200 ng de pcDNA3.1-GFP, como se describe en *Materiales y Métodos*, y lisada a las 24 y 48 horas post-transfección. Posteriormente se evaluó la expresión de GFP por *western blot*.

Como puede verse en la **Figura 17**, la línea COS7-shGFP disminuyó la expresión de la proteína GFP, tanto a las 24 horas como a las 48 horas post-transfección, comparado con el control (COS7-shNSP3). Sin embargo, en ninguno de los casos la expresión es inhibida por completo.

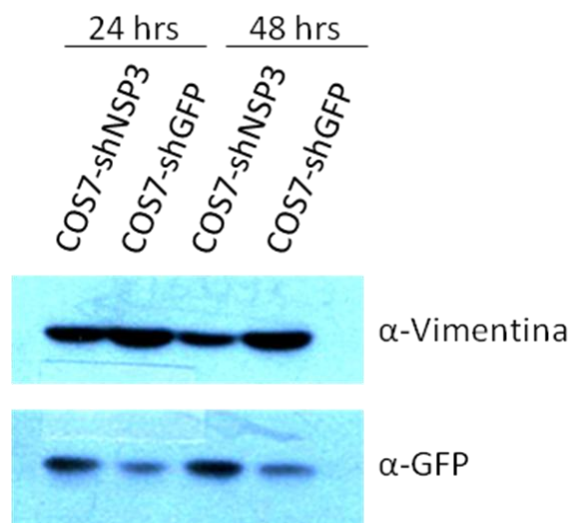


Figura 17. Expresión de GFP en la línea CO7-shGFP. Células COS7-shGFP transfectadas con 200 ng de pcDNA-GFP y cosechadas a las 24 y 48 horas post-transfección. Este experimento se realizó por triplicado (n=3).

Debido a que se desea usar esta línea celular en el futuro para hacer estudios en el contexto de una infección, se probó si el virus RRV producía algún cambio en la inhibición de la expresión de GFP de la línea COS7-shGFP, así que se repitió el experimento de la **Figura**

17, *i.e.* se transfectó pcDNA3.1-GFP y se cosechó a las 48 horas pero ahora en presencia de virus, donde también pudo observarse la disminución de la expresión de GFP comparado con la línea control (COS7-shNSP3) (**Figura 18**). Tanto en la línea COS7-shGFP como en la línea control COS7-shNSP3, no parece apreciarse un efecto claro de la infección viral sobre la expresión de GFP, es decir, sobre el procesamiento y la función de los shRNA's. La línea celular COS7-shGFP sigue siendo capaz de disminuir la expresión de GFP, incluso en presencia de virus; y la infección viral en la línea control COS7-shNSP3 no parece tener un efecto sobre la expresión del plásmido pcDNA3.1-GFP en dicha línea.

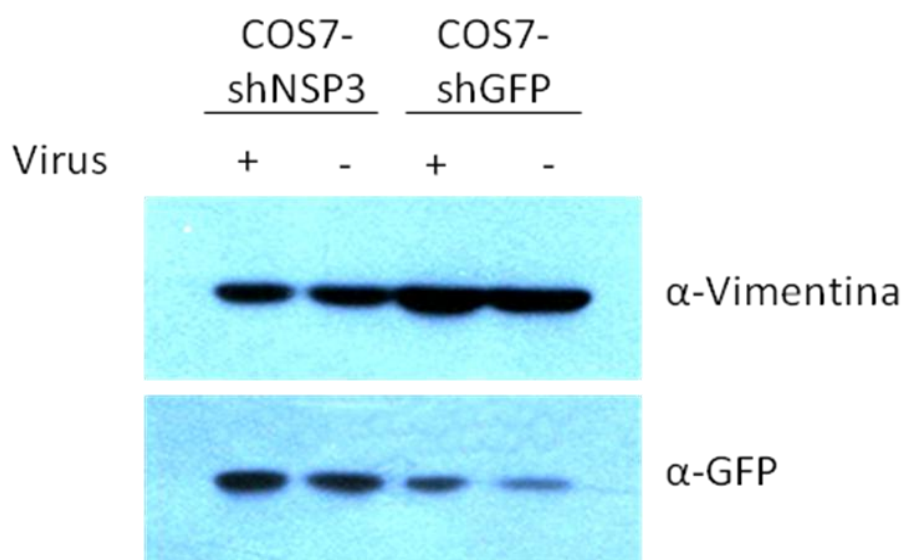


Figura 18. Expresión de GFP en COS7-shGFP infectadas. La expresión de GFP disminuye considerablemente en la línea COS7-shGFP, comparada con el control COS7-shNSP3, incluso en presencia de virus. Se transfectaron 200 ng de pcDNA-GFP, se infectaron con una M.O.I de 5 durante 9 horas, y se cosecharon 48 horas post-transfección. Este experimento se realizó por duplicado (n=2).

Evaluación de la línea COS7-shNSP3

Para evaluar la inhibición de la expresión de NSP3 en la línea COS7-shNSP3, se transfectó el plásmido pcDNA3.1-N3, que contiene el gen completo de NSP3 de RRV con una etiqueta (Flag-Estreptavidina) en el extremo amino-terminal (**Apéndice A**). Ésto se hizo para analizar la inhibición de la expresión de NSP3 exógena en ausencia de la infección

viral, y evitar posibles efectos del virus sobre dicha inhibición, ya que en presencia de todas las proteínas virales el procesamiento de los shRNA's podría ser diferente. Sin embargo, como puede verse en la **Figura 19**, en la línea celular control (COS7-shGFP), *i.e.* la que no inhibe la expresión de NSP3, el anticuerpo α -NSP3 (Suero 2 C-92) usado en el laboratorio no fue capaz de detectar la presencia de la proteína viral proveniente del plásmido, pero sí la presencia de NSP3 proveniente de una infección por RRV (**Figura 19**).

Pese a lo anterior, como ya se mencionó, la construcción usada posee un Flag en el N-terminal por lo que pudo ser detectada usando un anticuerpo α -Flag, que como puede verse en la **Figura 19** detecta la proteína proveniente de la expresión del pcDNA3.1-N3 en la línea COS7-shGFP.

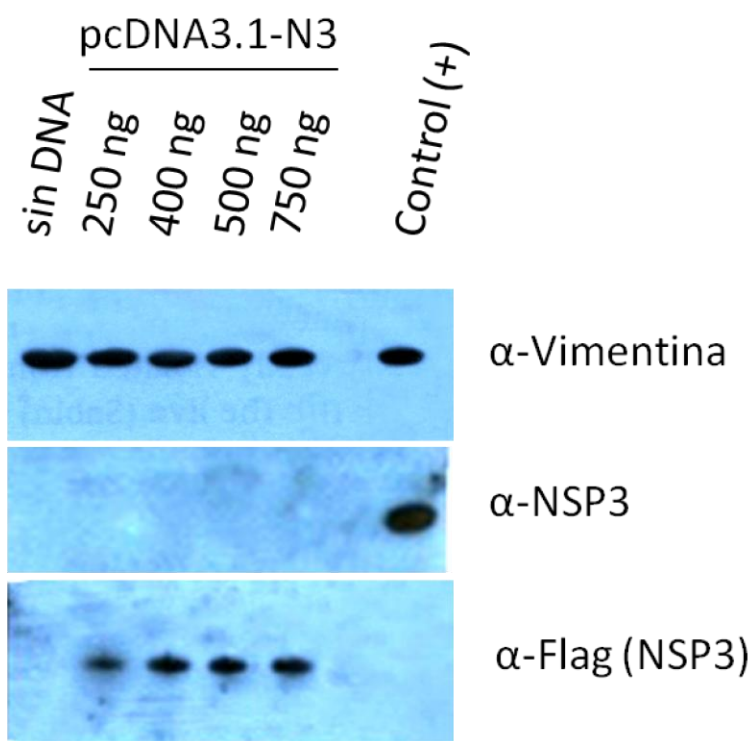


Figura 19. Expresión de NSP3 en la línea COS7-shGFP. Las células COS7-shGFP se transfectaron con diferentes cantidades (250 ng, 400 ng, 500 ng y 750 ng) del plásmido pcDNA3.1-N3, y se cosecharon a las 48 horas post-transfección. Como control (+) se utilizó un lisado de células infectadas por RRV con una MOI de 5, y cosechadas a las 9 hrs. p.i. Este experimento se realizó por duplicado (n=2).

Una vez que pudo detectarse la expresión de la proteína NSP3 proveniente del pcDNA3.1-N3 en la línea control COS7-shGFP, ambas líneas celulares se transfectaron con 400 ng de dicho plásmido, como se describe en *Materiales y Métodos*. Como puede verse en la **Figura 20** la línea COS7-shNSP3 sí disminuye la expresión de NSP3 exógena, comparada con el control (COS7-shGFP), teniendo mayor efecto a las 48 horas post-transfección.

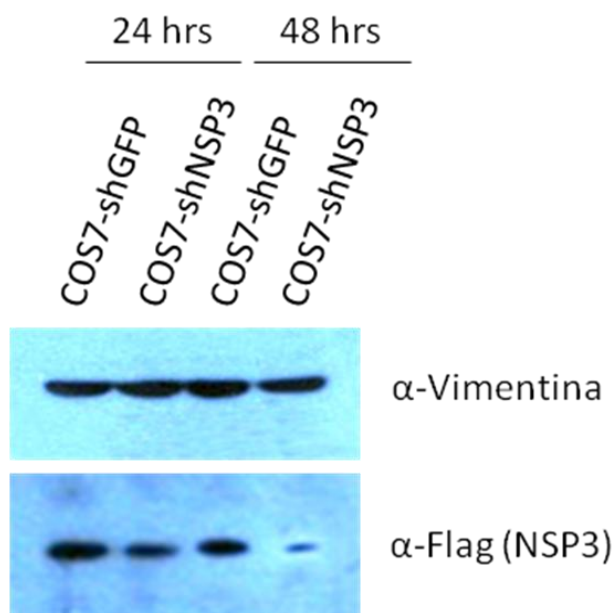


Figura 20. Expresión de NSP3 proveniente de pcDNA3.1-N3. Células COS7-shNSP3 y COS7-shGFP (control) transfectadas con 400 ng del vector pcDNA-N3 y cosechadas a las 24 y 48 horas post-transfección. Este experimento se realizó por triplicado (n=3).

Posteriormente se evaluó si la presencia del virus tenía algún efecto sobre la inhibición de la expresión de NSP3 en la línea COS7-shNSP3, de manera similar a como se hizo previamente para la línea COS7-shGFP (**Figura 18**). Como puede verse en la **Figura 21** la línea celular COS7-shNSP3 inhibe la expresión de NSP3 exógena, *i.e.* NSP3 marcado con Flag, y la presencia del virus parece no tener efecto alguno sobre la inhibición de la expresión de la proteína NSP3.

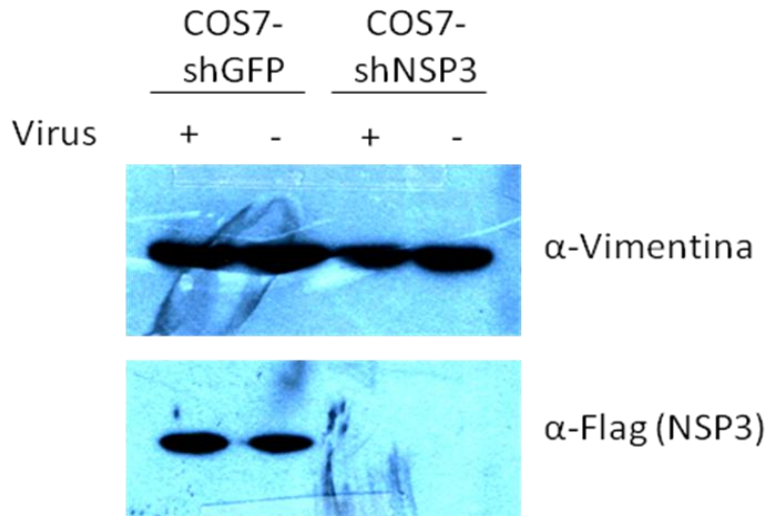


Figura 21. Expresión de NSP3 exógena en presencia de virus. La expresión de NSP3 proveniente del vector pcDNA3.1-N3 es inhibida en la línea COS7-shNSP3, comparada con el control (COS7-shGFP). El virus no parece tener efecto alguno en ninguna de las dos líneas. Se transfectaron 400 ng de pcDNA3.1-N3 en cada línea. Este experimento se realizó por duplicado (n=2).

Posteriormente además de evaluar la expresión de NSP3 proveniente del plásmido, también se evaluó la expresión de NSP3 proveniente de la infección por RRV. Como puede observarse en la **Figura 22**, la expresión de NSP3 proveniente del vector está prácticamente apagada en la línea celular COS7-shNSP3, además de que la infección viral parece no tener diferencia significativa con respecto a la inhibición de la expresión de NSP3, como ya se había observado anteriormente (**Figura 21**). Además, la expresión de NPS3 proveniente de la infección por rotavirus también disminuye en la línea COS7-shNSP3, tomando en cuenta que el anticuerpo α -NSP3 no es capaz de detectar la proteína proveniente del pcDNA3.1-N3 sino sólo la que proviene de una infección por rotavirus como se vio anteriormente (**Figura 19**).

En estos ensayos también se evaluó la expresión de las proteínas estructurales durante la infección de la línea COS7-shNSP3, *i.e.* con bajos niveles de NSP3o ausencia del mismo. Lo anterior se realizó por medio de *western blot* usando el anticuerpo α -TLP's. Como puede verse en la **Figura 22** no parece haber variación en la cantidad de proteínas virales producidas en la línea COS7-shNSP3 y la línea control COS7-shGFP, *i.e.* en niveles bajos

de NSP3 o ausencia del mismo, las proteínas estructurales de rotavirus se expresan de manera normal

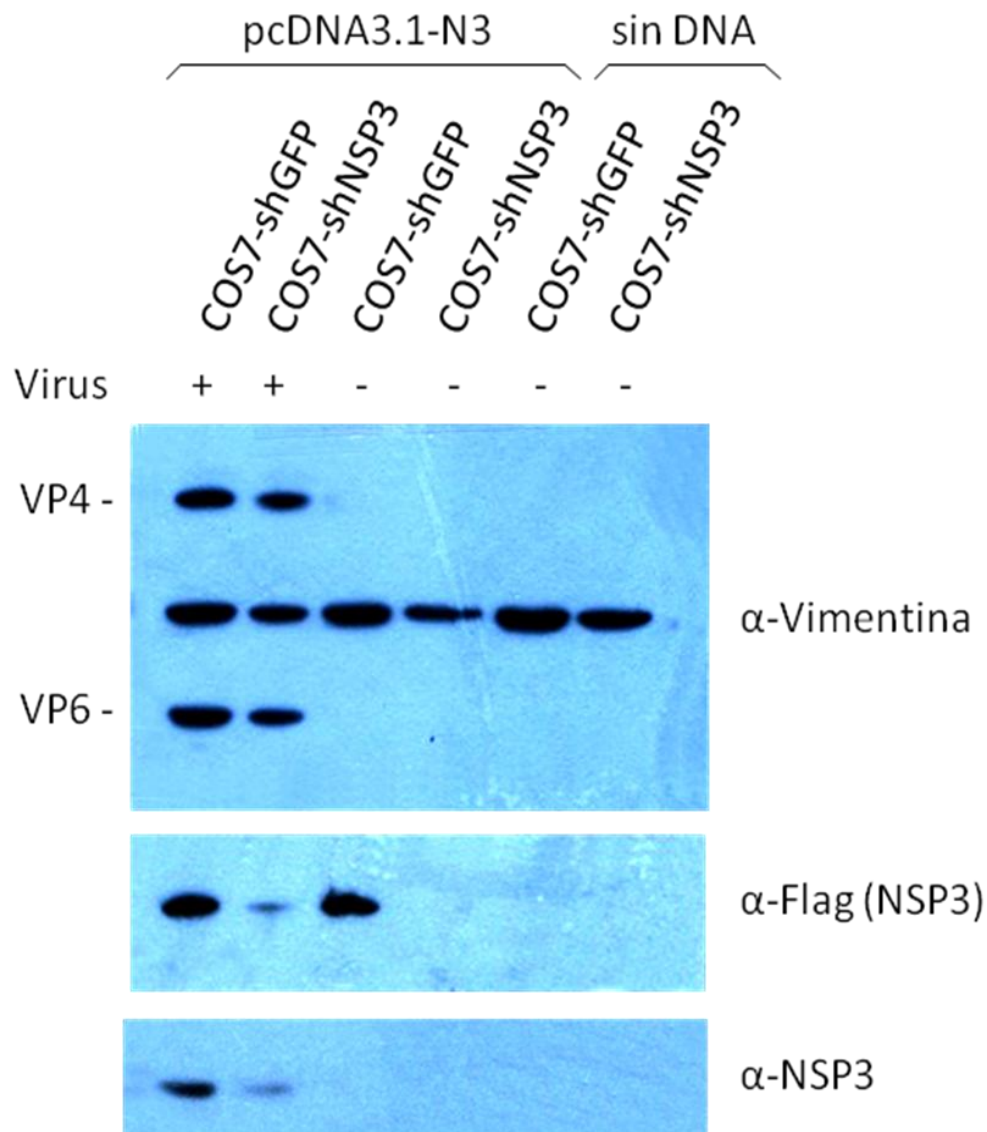


Figura 22. Análisis de la inhibición de NSP3 en células infectadas. *Western blot* donde se analizó la expresión de NSP3 transfectado (α -Flag) o proveniente de una infección por RRV (α -NSP3). Las células fueron infectadas con una MOI de 5 y cosechadas a las 9 hrs. p.i. Puede observarse la expresión de proteínas estructurales en ambas líneas celulares. Este experimento se realizó por duplicado (n=2).

DISCUSIÓN

En este trabajo se generó una línea celular que expresa establemente un shRNA dirigido contra la proteína viral NSP3. Dicha línea será una gran herramienta para el estudio de la proteína NSP3, y en conjunto con las construcciones generadas (**Apéndice A**) permitirá el estudio detallado de cada uno de los dominios que la componen. Pero es aún más importante, que el estudio de la proteína viral NSP3 y la caracterización de la función de sus dominios, por primera vez podrá llevarse a cabo en el contexto de una infección, *i.e.* en presencia de las demás proteínas virales.

La línea celular COS7-shGFP, como se mencionó inicialmente, se generó para ser usada como control de la línea COS7-shNSP3, ya que fue sometida a los mismos tratamientos de selección que esta última, lo que incluso la hace un control más fiel que la línea parental COS7.

Nuestros resultados sugieren que línea COS7-shGFP disminuye la expresión de la proteína GFP transfectada por el plásmido pcDNA-GFP, tanto a las 24 como a las 48 horas post-transfección. Sin embargo, no hay una inhibición total (**Figura 17**), y esto puede ser debido a las diferencias en la cantidades de proteínas que se cargaron en el gel de la **Figura 17**, donde las muestras provenientes de la línea COS7-shGFP claramente tenían más proteína que las provenientes de la COS7-shNSP3 (**Figura 17**). Por alguna razón, las muestras de la línea COS7-shGFP tuvieron más proteína que las de la línea COS7-shNSP3 en las dos repeticiones. Probablemente esta inhibición parcial puede ser debida a que es necesario someter esta línea celular a selección clonal, como se discutirá más adelante con la línea COS7-shNSP3. También pudo evaluarse que, en células transfectadas, la infección con la cepa RRV de rotavirus parece no tener efecto alguno sobre la inhibición de la expresión de GFP por la línea celular COS7-shGFP (**Figura 18**), es decir, en células transfectadas la línea celular COS7-shGFP es capaz de inhibir la expresión de la proteína GFP, aún durante la infección por Rotavirus.

La línea celular COS7-shNSP3, que se generó para utilizarse como herramienta en el estudio y caracterización de la proteína NSP3 de rotavirus, sí inhibe la expresión de NSP3 proveniente de la transfección de un plásmido tanto en ausencia de virus (**Figura 20**) como en la presencia del mismo (**Figuras 20 y 21**). Además, en células transfectadas, la línea COS7-shNSP3 también es capaz de disminuir la expresión de la proteína NSP3 proveniente de la infección por rotavirus, como pudo determinarse usando el anticuerpo α -NSP3 (**Figura 22**), y no sólo la expresión de NSP3 proveniente del plásmido pcDNA3.1-N3. El anticuerpo policlonal α -NSP3 (Suero 2 C-92) empleado en el laboratorio, es capaz de detectar sólo la presencia de la proteína NSP3 proveniente de una infección viral, pero no detecta la expresión de NSP3 proveniente del plásmido transfectado (**Figura 19**). Lo anterior puede deberse a 2 factores: i) Los niveles de expresión de NSP3 en células infectadas son bastante superiores a los generados por la expresión del pcDNA3.1-N3 a las 48 hrs (a pesar de tener el promotor de CMV), y la sensibilidad del anticuerpo α -NSP3 es inferior a la del α -Flag; o ii) la proteína NSP3 generada de la expresión del pcDNA3.1-N3, en ausencia de las otras proteínas virales, no es capaz de plegarse de la misma forma que se pliega en el contexto de una infección, y el anticuerpo policlonal usado no es capaz de reconocerla, aunque esta posibilidad es bastante remota debido a que se usaron condiciones desnaturalizantes en los *western blots*. Sin embargo, la expresión del pcDNA3.1-N3 sí puede ser detectada al usar el anticuerpo monoclonal α -Flag debido a que es más específico por su ligando que el α -NSP3 (Suero 2 C-92). También podría contemplarse la posibilidad de que existan epítopes inmunodominantes en el N-terminal de NSP3, de modo que la mayor proporción del anticuerpo policlonal α -NSP3 (Suero 2 C-92) reconozca solamente dicha región, y que la presencia de la Estreptavidina-Flag en el N-terminal de la construcción pcDNA3.1-N3 pudiera evitar el reconocimiento por el α -NSP3 (Suero 2 C-92).

Al igual que con la línea COS7-shGFP, en la línea COS7-shNSP3 el virus parece no tener efecto alguno sobre la inhibición de la expresión de la proteína blanco, en este caso NSP3 viral; o sobre la inhibición de la expresión de la proteína NSP3 exógena, proveniente del vector pcDNA3.1-N3 (**Figuras 21 y 22**).

De igual forma que con la línea COS7-shGFP, la inhibición de la expresión de NSP3 por la línea COS7-shNSP3 fue parcial. Lo anterior puede deberse a que ninguna de las 2 líneas celulares generadas en este trabajo han sido sometidas a selección clonal, y posiblemente están compuestas de una mezcla de poblaciones celulares, que se seleccionaron inicialmente en las cajas de 48 pozos y luego se fueron creciendo, por lo que es probable que algunas de ellas no posean el inserto con el shRNA pero sí el gen de resistencia a puromicina; o bien, que sí posean el inserto con el shRNA pero éste se encuentre en alguna región del genoma de difícil expresión, *e.g.* heterocromatina. Es necesario tomar en cuenta que el ensayo de PCR realizado sobre el DNA purificado de las líneas celulares (**Figura 12**), nos permite ver que existen moléculas del inserto (shRNA) en la población celular seleccionadas, pero no necesariamente indica que éste esté presente en toda la población celular, es por eso que se requiere de una selección clonal, para mejorar la inhibición de la expresión de las proteínas blanco (GFP y NSP3, respectivamente).

También pudo observarse que las proteínas estructurales de rotavirus pueden expresarse en la línea COS7-shNSP3 infectada (**Figura 22**), lo que sugiere que en ausencia de NSP3 o en bajos niveles de la misma, las proteínas estructurales VP4 y VP6 pueden ser expresadas. Estos datos concuerdan con experimentos previamente realizados por la Dra. Hilda Montero en nuestro laboratorio (Montero et al, 2006), donde muestran que en células MA104, en las que se silenció la expresión de NSP3 mediante siRNA's, la síntesis de proteínas virales no se ve afectada y los rotavirus son capaces de replicarse y formar progenia viral (Montero et al, 2006). También se observó lo mismo en experimentos realizados en la línea MA104 por el grupo del Dr. Patton, donde utilizan una cepa SA11 de rotavirus que produce proteínas NSP3 mutantes, y al parecer no se afecta la traducción de las demás proteínas virales (Arnold et al, 2012). Como mencionamos en los antecedentes, existen reportes en donde se demuestra que la proteína NSP3 es esencial para la traducción de los mRNA's virales (Keryer-Bibens et al, 2009; Vende et al, 2000), sin embargo, es importante resaltar que ninguna de estas pruebas se realizó en el contexto de una infección viral, *i.e.* en células infectadas. Todos estos estudios se han realizado en sistemas *in vitro* o con proteínas aisladas, por lo que la hipótesis más probable sobre el funcionamiento de

NSP3 durante una infección, es que la expresión de esta proteína no es necesaria para la traducción de las otras proteínas virales.

Además de estas líneas celulares, en este proyecto también se generó una serie de construcciones (datos no mostrados) que expresan los diferentes dominios de NSP3, así como mutantes de las mismas, en las que la expresión de esta proteína no debería ser inhibida usando las secuencias de shRNA's o siRNA's con las que trabajamos, ya que tienen mutaciones puntuales en el sitio de interacción con el siRNA's usado (**Apéndice A**). En conjunto, estas líneas celulares y las construcciones generadas (**Apéndice A**), podrán usarse posteriormente como herramientas para el estudio de la proteína NSP3, lo que ayudaría en la comprensión de la función de cada uno de los dominios de NSP3 durante una infección. A diferencia de los trabajos realizados por otros grupos (Harb et al, 2008; Keryer-Bibens et al, 2009; Michel et al, 2000; Piron et al, 1999; Piron et al, 1998; Poncet et al, 1993; Poncet et al, 1996; Vende et al, 2000; Vitour et al, 2004), lo anterior tendría la ventaja de estudiar cada uno de los dominios por separado, transfectando las diferentes construcciones de NSP3 en la línea COS7-shNSP3, y como control en la línea COS7-shGFP, e incluso se podrán hacer ensayos de recuperación de función usando las construcciones mutantes que no son degradadas por los siRNA's o shRNA's usados en este trabajo (**Apéndice A**).

Se había contemplado la posibilidad de que los rotavirus, al igual que varios virus de plantas y algunos de animales, pudieran tener un mecanismo capaz de inhibir alguno de los componentes del sistema encargado del procesamiento de los miRNA's (Li et al, 2002; Li & Ding, 2001; Lindenbach & Rice, 2002; Vance & Vaucheret, 2001). Sin embargo, el silenciamiento de GFP y NSP3 en células que poseen el shRNA dirigido contra cada una, en presencia de rotavirus, no se afecta de manera considerable. Así que el presente trabajo sugiere que en la infección por rotavirus no existe un sistema similar al encontrado en plantas y algunos animales, al menos para la cepa RRV. Sin embargo, es importante considerar que estos experimentos en presencia del virus fueron realizados siempre en células transfectadas.

Además, como ya se sabe, los siRNA's tienen algunas limitaciones que con esta línea celular COS7-shNSP3 se podrían superar, por ejemplo, se podría contribuir en la inhibición completa de la expresión de NSP3, usando esta línea celular para transfectar siRNA's contra NSP3, y así sumar el efecto de la expresión estable de un shRNA y el de la transfección transitoria de un siRNA, contribuyendo a mejorar la inhibición de la expresión de NSP3.

CONCLUSIONES

- Las líneas celulares COS7-shGFP y COS7-shNSP3 son resistentes a puromicina (5 $\mu\text{g/ml}$).
- Las líneas celulares COS7-shNSP3 y COS7-shGFP contienen el inserto que codifica para el shRNA específico para cada una.
- Las líneas celulares COS7-shNSP3 y COS7-shGFP disminuyen la expresión de su proteína blanco, proveniente de un plásmido transfectado.
- Las líneas celulares COS7-shNSP3 y COS7-shGFP, **en presencia de rotavirus**, disminuyen la expresión de su proteína blanco, proveniente de un plásmido transfectado.
- La línea COS7-shNPS3 disminuye la expresión de la proteína NSP3 de origen viral, durante la infección por RRV.
- El anticuerpo policlonal α -NSP3 (Suero 2 C-92) no es capaz de detectar por *western blot* a la proteína NSP3, proveniente de la expresión del plásmido pcDNA3.1-N3. Dicho anticuerpo sólo funciona con NSP3 proveniente de una infección por RRV.
- La cepa RRV de rotavirus parece no tener efecto sobre la inhibición de la expresión de las líneas COS7-shNSP3 y COS7-shGFP. Lo anterior sugiere que no existe un sistema de inhibición del procesamiento de los shRNA's en rotavirus, como existe en algunas plantas y animales.
- La cepa RRV de rotavirus es capaz de expresar las proteínas estructurales en la línea COS7-shNSP3, es decir, niveles bajos de NSP3 o ausencia de la misma permiten la expresión de las proteínas estructurales durante la infección, lo que concuerda con los experimentos de la Dra. Montero en nuestro laboratorio (Montero et al, 2006), y con los del grupo del Dr. Patton (Arnold et al, 2012), donde demuestran que la proteína NSP3 no es necesaria para la expresión de las otras proteínas virales durante la infección por rotavirus.

PERSPECTIVAS

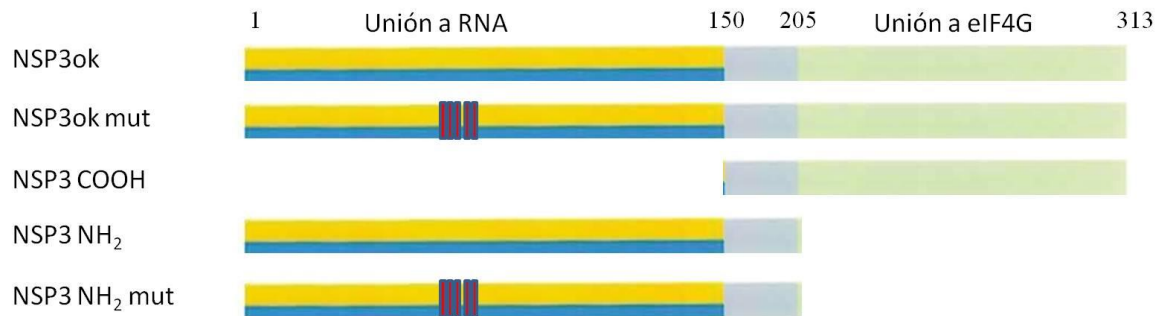
Estas líneas celulares, en conjunto con las construcciones generadas en este trabajo (**Apéndice A**), podrán usarse para identificar la función de cada uno de los dominios de la proteína NSP3 de rotavirus, en el contexto de una infección. Las construcciones mutantes (**Apéndice A**) podrán ser usadas para ensayos de recuperación de la función, ya que en teoría su expresión no es inhibida por los shRNA's usados en este trabajo, a diferencia de las proteínas silvestres. Con el uso de estas herramientas podrá caracterizarse la función de cada uno de los dominios de NSP3, y esclarecer el papel de NSP3 durante la infección por rotavirus.

También, es importante recalcar que usando la línea celular COS7-shNSP3 se podrá superar la limitación de los siRNA's, con respecto a la inhibición de la expresión de su proteína blanco. Se debe tomar en cuenta que las dos líneas generadas en este trabajo fueron hechas para funcionar como control una de la otra, debido a que fueron expuestas a los mismos tratamientos y mismas condiciones.

Es importante contemplar la opción de someter estas líneas a una selección clonal, para mejorar la inhibición de la expresión de su proteína blanco, que como ya se demostró no es una inhibición total.

APÉNDICE A

Se generaron 5 mutantes del gen de NSP3, utilizando el vector de expresión pcDNA3.1(+)/Neo (**Figura 23**).



Cortesía de Andrea Peralta:



Figura 23. Esquema de la estructura primaria de las proteínas generadas por las construcciones. La región de unión a RNA de la proteína NSP3 se encuentra del aminoácido 1 al 150, la región de dimerización de los aminoácidos 150-205 y la región de unión a eIF4G se encuentra del aminoácido 205-313.

Donde:

- *pcDNA3.1-NSP3ok* contiene la secuencia completa del gene de NSP3 de la cepa de rotavirus usada en el laboratorio (RRV).
- *pcDNA3.1-NPS3ok mut* contiene la secuencia completa del gene de NSP3 de la cepa RRV de rotavirus, más 5 mutaciones puntuales en los nucleótidos 292, 295, 298, 301 y 304 del gen de NSP3 de la misma cepa (GenBank: HQ846849.1), que evitan que hibride con el siRNA.
- *pcDNA3.1-NSP3 COOH* contiene sólo el dominio de dimerización y el dominio de unión a eIF4G.

- *pcDNA3.1-NSP3 NH2* contiene sólo el dominio de unión al RNA y el dominio de dimerización.
- *pcDNA3.1-NSP3 NH2 mut* es igual a la construcción *NSP3 NH2* pero contiene las 5 mutaciones puntales en los nucleótidos 292, 295, 298, 301 y 304 del gene de NSP3 de rotavirus cepa RRV (GenBank: HQ846849.1), al igual que la construcción *NSP3ok mut*.
- *pcDNA3.1-N3* contiene la secuencia completa del gene NSP3 de RRV, más un fragmento de estreptavidina (en gris) y el marcador FLAG (en rojo).

Nota:

Todas las construcciones fueron clonadas en el plásmido *pcDNA3.1(+)/Neo* de Invitrogen.

BIBLIOGRAFÍA

Arias CF, Isa P, Guerrero CA, Mendez E, Zarate S, Lopez T, Espinosa R, Romero P, Lopez S (2002) Molecular biology of rotavirus cell entry. *Arch Med Res* **33**: 356-361

Arias CF, Romero P, Alvarez V, Lopez S (1996) Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity. *J Virol* **70**: 5832-5839

Arnold MM, Brownback CS, Taraporewala ZF, Patton JT (2012) Rotavirus variant replicates efficiently although encoding an aberrant NSP3 that fails to induce nuclear localization of poly(A)-binding protein. *The Journal of general virology* **93**: 1483-1494

Deo RC, Graft CM, Rajashankar KR, Burley SK (2002) Recognition of the rotavirus mRNA 3' consensus by an asymmetric NSP3 homodimer. *Cell* **108**: 71-81

Desselberger U, Gray UDaJ. (2003) Viral gastroenteritis. ELSEVIER SCIENCE TECHNOLOGY, Guernsey, United Kingdom.

Fabbretti E, Afrikanova I, Vascotto F, Burrone OR (1999) Two non-structural rotavirus proteins, NSP2 and NSP5, form viroplasm-like structures in vivo. *The Journal of general virology* **80 (Pt 2)**: 333-339

Fields BN, Knipe DM, Howley PM (2006) *Fields virology*, 6th ed edn. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health, c2013.

Gluzman Y (1981) SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* **23**: 175-182

Guerrero CA, Bouyssounade D, Zarate S, Isa P, Lopez T, Espinosa R, Romero P, Mendez E, Lopez S, Arias CF (2002) Heat shock cognate protein 70 is involved in rotavirus cell entry. *J Virol* **76**: 4096-4102

Guerrero CA, Mendez E, Zarate S, Isa P, Lopez S, Arias CF (2000) Integrin alpha(v)beta(3) mediates rotavirus cell entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 14644-14649

Harb M, Becker MM, Vitour D, Baron CH, Vende P, Brown SC, Bolte S, Arold ST, Poncet D (2008) Nuclear localization of cytoplasmic poly(A)-binding protein upon rotavirus infection involves the interaction of NSP3 with eIF4G and RoXaN. *J Virol* **82**: 11283-11293

He L, Hannon GJ (2004) MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature reviews Genetics* **5**: 522-531

Jayaram H, Estes MK, Prasad BV (2004) Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. *Virus Res* **101**: 67-81

Kapp LD, Lorsch JR (2004) The molecular mechanics of eukaryotic translation. *Annu Rev Biochem* **73**: 657-704

- Keryer-Bibens C, Legagneux V, Namanda-Vanderbeken A, Cosson B, Paillard L, Poncet D, Osborne HB (2009) The rotaviral NSP3 protein stimulates translation of polyadenylated target mRNAs independently of its RNA-binding domain. *Biochem Biophys Res Commun* **390**: 302-306
- Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN (2002) MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J* **21**: 4663-4670
- Li H, Li WX, Ding SW (2002) Induction and suppression of RNA silencing by an animal virus. *Science* **296**: 1319-1321
- Li WX, Ding SW (2001) Viral suppressors of RNA silencing. *Current opinion in biotechnology* **12**: 150-154
- Lindenbach BD, Rice CM (2002) RNAi targeting an animal virus: news from the front. *Molecular cell* **9**: 925-927
- Lopez S, Arias CF, Bell JR, Strauss JH, Espejo RT (1985) Primary structure of the cleavage site associated with trypsin enhancement of rotavirus SA11 infectivity. *Virology* **144**: 11-19
- Lopez T, Camacho M, Zayas M, Najera R, Sanchez R, Arias CF, Lopez S (2005) Silencing the morphogenesis of rotavirus. *J Virol* **79**: 184-192
- Meister G, Tuschl T (2004) Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* **431**: 343-349
- Mello CC, Conte D, Jr. (2004) Revealing the world of RNA interference. *Nature* **431**: 338-342
- Michel YM, Poncet D, Piron M, Kean KM, Borman AM (2000) Cap-Poly(A) synergy in mammalian cell-free extracts. Investigation of the requirements for poly(A)-mediated stimulation of translation initiation. *The Journal of biological chemistry* **275**: 32268-32276
- Montero H, Arias CF, Lopez S (2006) Rotavirus Nonstructural Protein NSP3 is not required for viral protein synthesis. *J Virol* **80**: 9031-9038
- Novina CD, Sharp PA (2004) The RNAi revolution. *Nature* **430**: 161-164
- Patton JT, Vasquez-Del Carpio R, Spencer E (2004) Replication and transcription of the rotavirus genome. *Current pharmaceutical design* **10**: 3769-3777
- Piron M, Delaunay T, Grosclaude J, Poncet D (1999) Identification of the RNA-binding, dimerization, and eIF4GI-binding domains of rotavirus nonstructural protein NSP3. *J Virol* **73**: 5411-5421
- Piron M, Vende P, Cohen J, Poncet D (1998) Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4GI and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F. *EMBO J* **17**: 5811-5821
- Poncet D, Aponte C, Cohen J (1993) Rotavirus protein NSP3 (NS34) is bound to the 3' end consensus sequence of viral mRNAs in infected cells. *J Virol* **67**: 3159-3165
- Poncet D, Aponte C, Cohen J (1996) Structure and function of rotavirus nonstructural protein NSP3. *Archives of virology* **12**: 29-35

- Rao DD, Vorhies JS, Senzer N, Nemunaitis J (2009) siRNA vs. shRNA: similarities and differences. *Advanced drug delivery reviews* **61**: 746-759
- Sen A, Feng N, Ettayebi K, Hardy ME, Greenberg HB (2009) IRF3 inhibition by rotavirus NSP1 is host cell and virus strain dependent but independent of NSP1 proteasomal degradation. *J Virol* **83**: 10322-10335
- Sherry B (2009) Rotavirus and reovirus modulation of the interferon response. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* **29**: 559-567
- Silvestri LS, Tortorici MA, Vasquez-Del Carpio R, Patton JT (2005) Rotavirus glycoprotein NSP4 is a modulator of viral transcription in the infected cell. *J Virol* **79**: 15165-15174
- Singer RH (1996) RNA: traffic report. *Trends Cell Biol* **6**: 486-489
- Smith M, Jessee J (1990) High efficiency bacterial electroporation: 1 x 10¹⁰ E. coli transformants/ μ g. *Focus* **12**: 38-40
- Taraporewala ZF, Patton JT (2001) Identification and characterization of the helix-destabilizing activity of rotavirus nonstructural protein NSP2. *J Virol* **75**: 4519-4527
- Taraporewala ZF, Patton JT (2004) Nonstructural proteins involved in genome packaging and replication of rotaviruses and other members of the Reoviridae. *Virus Res* **101**: 57-66
- Taraporewala ZF, Schuck P, Ramig RF, Silvestri L, Patton JT (2002) Analysis of a temperature-sensitive mutant rotavirus indicates that NSP2 octamers are the functional form of the protein. *J Virol* **76**: 7082-7093
- Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, Steele AD, Duque J, Parashar UD (2012) 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet infectious diseases* **12**: 136-141
- Vance V, Vaucheret H (2001) RNA silencing in plants--defense and counterdefense. *Science* **292**: 2277-2280
- Vende P, Piron M, Castagne N, 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
- Vitour D, Lindenbaum P, Vende P, Becker MM, Poncet D (2004) RoXaN, a novel cellular protein containing TPR, LD, and zinc finger motifs, forms a ternary complex with eukaryotic initiation factor 4G and rotavirus NSP3. *J Virol* **78**: 3851-3862
- Zarate S, Espinosa R, Romero P, Guerrero CA, Arias CF, Lopez S (2000) Integrin alpha2beta1 mediates the cell attachment of the rotavirus neuraminidase-resistant variant nar3. *Virology* **278**: 50-54