

00591
4 A



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

I N S T I T U T O D E B I O T E C N O L O G I A

**INHIBICION DE LA EXPRESION
DE GENES ESPECIFICOS DE ROTAVIRUS
MEDIANTE RNAs INTERFERENTES**

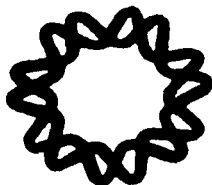
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

MIGUEL ANGEL DECTOR CARRILLO



CUERNAVACA, MORELOS

MARZO, 2003



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.

B

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

NOMBRE: Miguel Ángel
Déctor Carrillo

FECHA: 28-03-03

FIRMA: [Signature]

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. Carlos F. Arias Ortiz. Durante la realización de este trabajo conté con una beca de Doctorado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, 1999-2001, registro 80446) y con un apoyo económico del Howard Hughes Medical Institute (Enero 2002-Marzo 2003).

DEDICATORIA

A mis tres amores que Dios me dió

Mi amada esposa Carmen, mi compañera, mi otro yo, mi razón de existir

Mis hermosos hijos Axel y Alain , mi orgullo, amor que encarnó

Por ser mas hermosa la vida con ustedes de lo que yo pude haber imaginado

A ustedes con todo mi amor

A mis padres Flora e Isaias porque su recuerdo me acompaña día tras día

A mi tío Liborio, por haberme hecho sentir un ser especial, no te defraudaré

A mi hermanos Magda, Rubén y Carlos

A mis abuelitos Carmen y Angel

Los amo tanto como ustedes a mí, gracias por apoyarme siempre

*A toda mi gran familia Déctor, que afortunadamente somos muchos
y finalmente a Jehová mi Dios por guiar mi vida*

D

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Carlos Arias por haber aceptado ser mi asesor y maestro, por sus enseñanzas directas e indirectas, por el tiempo que me dedicó, por la confianza que depositó en mí y por su comprensión, mil gracias.

A los compañeros de laboratorio que encontré a mi ingreso al Doctorado y que colaboraron a mi formación científica: Rafa, Dra. Susana, Don Pedro, Ernesto y Miguel Angel .

A los Drs. Lorenzo Segovia y Guillermo Dávila, por su crítica constructiva durante todos los tutorales que me ayudó a ser un mejor estudiante.

A Xochitl Alvarado, Lorena López y Pedro Romero por participar directamente en la preparación de algunos experimentos importantes para este trabajo.

Al jurado: Drs. Patricia León, Claudia Treviño, Arturo Guevara, Celso Ramos, Fernando Esquivel, Carlos Arias y Mario Zurita, por sus observaciones tan acertadas que ayudaron definitivamente a que mi trabajo quedara mejor plasmado.

Al CONACyT por la beca tan importante que me otorgó, determinante para que yo pudiera realizar el Doctorado.

A la UNAM y al IBT porque mi vivencias en sus instalaciones me han enseñado que antes que ser mejor científico debo ser mejor ser humano. Siempre diré con orgullo que pertencí a ellas.

Al gran grupo Arias-López: Gina, Nedy, Fernando, Fernandito, Iris, Mariela, Selene, Ernesto, Pavel, Vicky, María Elena, Carlos Arturo, Denisse, Karla, Tere, Claudia, Minerva, Tomás, Marisol, Caludia, Vanessa, Mauricio, Liliana, Margara y los que se me pudieron olvidar en este momento, todos fueron grandes compañeros y de los cuales aprendí mucho de lo que se y soy ahora. En especial a Jimena, Martha, Rafa, Diana, Paz, nuevamente don Pedro, Pedrito, Pedrito RG y Miguel Angel, a ustedes gracias por hacer de mi estancia en Cuernavaca una experiencia más disfrutable, porque realmente me sentí estimado por ustedes y sépanlo que son correspondidos. Los recordaré desde Monterrey con mucho afecto.

E

ABREVIATURAS

A	nucleótido de adenina
aa	aminoácido
b	base o nucleótido
DLP	partícula viral de doble capa protéica
DNA	ácido desoxirribonucleico
h	hora
MEM	medio mínimo esencial
microRNAs	agrupación de RNAs pequeños
μl	10 ⁻⁶ litros
ml	10 ⁻³ litros
mM	milimolar
μM	micromolar
moi	multiplicidad de infección
NSPs	proteínas virales no estructurales
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
p.i.	postinfección
PKR	proteína cinasa R
p.l.f.	postlipofección
PTGS	silenciamiento génico postranscripcional
RdRp	RNA polimerasa dependiente de RNA
RE	retículo endoplásmico
RI	intermediario de replicación
RISC	complejo de silenciamiento inducido por RNA
RF	cepa bovina de rotavirus
RNA	ácido ribonucleico
RNA^{dc}	ácido ribonucleico de doble cadena
RNAⁱ	interferencia por RNA
RNA^m	RNA mensajero
RNA^{pol}	RNA polimerasa
RNasa	ribonucleasa
RRV	cepa de rotavirus del mono <i>Rhesus</i>
shRNA	RNA pequeño de estructura tallo-asa
siRNA	RNA interferente pequeño
siRNA^{VP4}	siRNA contra el RNA ^m de la proteína VP4
siRNA^{LamA/C}	siRNA contra el RNA ^m de la proteína LamA/C
stRNA	RNA pequeño temporal
s/s	sin suero fetal bovino
TLP	partícula viral de triple capa protéica
uff	unidad formadora de foco
VIGS	silenciamiento postranscripcional inducido por virus
VLPs	partículas semejantes a virus
YM	cepa porcina de rotavirus

INDICE

	Página
RESUMEN	2
SUMMARY	4
INTRODUCCION	6
Generalidades de los rotavirus	6
Ciclo replicativo de los rotavirus	11
Morfogénesis de los rotavirus	13
La "Interferencia por RNA" (RNAi)	23
OBJETIVO	38
HIPOTESIS	38
MATERIAL Y METODOS	39
RESULTADOS PUBLICADOS (ARTICULO)	51
RESULTADOS COMPLEMENTARIOS	58
Funcionalidad de la RNAi en las células MA104	58
Silenciamiento de la proteína VP4 mediante el sistema de RNAi	60
Caracterización de las partículas glabras	70
Función de la proteína VP4 en la morfogénesis viral	76
DISCUSION	80
CONCLUSIONES	87
PERSPECTIVAS	88
BIBLIOGRAFIA	90

RESUMEN

Los rotavirus son el principal agente causal de gastroenteritis en niños menores de 3 años. El genoma de los rotavirus consta de 11 segmentos de RNA de doble cadena, envueltos por tres capas concéntricas de proteína; la tercera de las cuales está formada por la proteína VP7 y por 60 espículas de la proteína VP4, que se proyectan desde la superficie. En la presente tesis doctoral se propuso como objetivo implementar una metodología que permitiera la inhibición eficiente de la expresión de genes específicos de los rotavirus. El método elegido está basado en un mecanismo ancestral propio de los organismos eucariontes, denominado "interferencia por RNA" o RNAi. El mecanismo de RNAi se activa por RNA de doble cadena (RNAdc) y dirige la degradación de los RNAs mensajeros (RNAs) que son idénticos en secuencia al RNAdc que lo activó. La RNAi se ha convertido en una herramienta molecular útil para silenciar genes a nivel postranscripcional en diversos sistemas experimentales de plantas, hongos, nemátodos, insectos, incluidas células de mamíferos. La RNAi puede ser inducida por fragmentos de RNAdc de 21-26 pb denominados RNAs interferentes pequeños (siRNAs, por small interfering RNAs).

Inicialmente para validar el sistema, se determinó la capacidad de los siRNAs para silenciar un gen endógeno (LamA/C) de la línea celular MA104, donde se han cultivado y estudiado los rotavirus. La eficiencia de silenciamiento en este sistema fue de $\approx 75\%$.

Posteriormente se analizó el efecto de un siRNA sintético (siRNA^{VP4}) para inhibir la expresión del gen que codifica para la proteína VP4 de los rotavirus y así observar el fenotipo de ausencia de VP4 en el contexto de una infección viral real.

Por su parte el siRNA^{VP4} fué capaz de inhibir la expresión de VP4 en células MA104 infectadas con el rotavirus RRV (rotavirus del mono *Rhesus*). El $\approx 75\%$ de las células infectadas no expresaron niveles detectables de VP4, y tanto la producción de partículas virales infecciosas como la concentración de la proteína VP4, se redujeron en un $\approx 75\%$. Además, la introducción del siRNA^{VP4} resultó en el ensamble de partículas virales glabras que carecen de la proteína VP4, es decir, no presentan las típicas espículas en su superficie. Dichas partículas glabras, como era de esperarse, no fueron infecciosas. La correlación de estos resultados con la eficiencia de la

transfección de los siRNAs específicos de VP4, estimada en ≈75% en las células MA104, sugiere que en las células transfectadas exitosamente, se inhibió por completo, o casi por completo la traducción de la proteína.

Notablemente la interferencia de la proteína VP4 fue altamente específica, puesto que la introducción del siRNA^{VP4} no afectó la acumulación de otras proteínas virales, ni tampoco la de proteínas VP4 de las cepas bovina RF y porcina YM, las cuales son diferentes en la secuencia nucleotídica del siRNA utilizado.

La efectividad de la inhibición de VP4 en cada célula infectada, permitió investigar las funciones sugeridas para VP4 en las últimas etapas de la morfogénesis viral, derivadas de la capacidad de VP4 de interactuar y permeabilizar membranas, además de poseer un dominio de fusión de membranas similar al del virus Semliki forest. En el análisis de microscopía electrónica de más de 20 células transfectadas con el siRNA^{VP4} e infectadas con RRV, se apreciaron partículas virales gemando desde los viroplasma hacia el lumen del retículo endoplásmico, así como partículas maduras que habían perdido la membrana lipídica intermediaria. Estas dos etapas finales en la morfogénesis viral ocurrieron de manera normal, tal como sucede en las células control, con lo cual se infiere que VP4 no parece participar en ninguno de estos dos eventos.

La metodología implementada abre la posibilidad tanto para estudiar la función de otros genes de este virus, como de realizar estudios de genética reversa en la familia *Reoviridae*.

SUMMARY

Rotaviruses are the leading cause of gastroenteritis in children less than three years old. Rotavirus genome is formed by eleven segments of double stranded RNA (dsRNA) surrounded by three concentric layers of protein. The outer most layer is formed by VP7, and by sixty spikes of protein VP4, which project from the viral surface. In the present doctoral thesis an effective system to inhibit the expression of rotavirus specific genes was developed. The system is based in an ancient mechanism present in the eukaryotic organisms, named RNA interference (RNAi). The RNAi mechanism is triggered by dsRNA and results in the degradation of the messenger RNAs which share an identical sequence to the dsRNA that triggered it. RNAi has become an useful molecular tool for postranscriptional gene silencing in several organisms (plants, fungi, nematodes, insects, etc) including mammalian cells. RNAi can be triggered by RNA fragments of 21-26 base pairs, named small interfering RNAs (siRNAs). In the present work, a synthetic siRNA (siRNA^{VP4}) designed to inhibit the mRNA encoding the rotavirus VP4 protein was used as a model of rotavirus gene silencing, with the aim of investigating the phenotype resulting from the absence of VP4, in the context of a viral infection.

The ability of the siRNAs to inhibit an endogenous gene (LamaA/C) in the cell line MA104 (*Rhesus* monkey kidney cells), which is a cell line that has been used to grow and study the biology of rotavirus was initially determined. In this case the silencing efficiency was stimated to be around 75%. Then, the capability of a synthetic siRNA (siRNA^{VP4}) to inhibit the synthesis of rotavirus VP4 protein was evaluated in rotavirus-infected MA104. The siRNA^{VP4} was able to inhibit the expression of VP4 protein. Seventy five per cent of all infected cells had non detectable levels of VP4, and the production of infectious viral particles, as well as the synthesis of the VP4 protein, were also reduced by 75%. In addition, particles lacking VP4 (named spikeless) were assembled. As expected these spikeless particles were non infectious. Correlation of these findings with the siRNAs transfection efficiency suggests that in the successfully transfected cells the inhibition of the VP4 synthesis was complete. Furthermore, the interference of VP4 was highly specific, since neither the synthesis of other viral proteins, nor the VP4 proteins from two other rotavirus strains (bovine RF or porcine YM), which are different in the siRNA^{VP4} target sequence, were affected.

The high efficiency for silencing VP4 in infected cells, prompted us to investigate the suggested role for this protein in the viral morphogenesis by means of electron microscopy analysis. The analysis of more than twenty RNA^{VP4}-transfected rotavirus-infected cells, revealed particles budding from the viroplasm into the lumen of the reticulum endoplasmic, as well as mature particles lacking the intermediate membrane, showing a pattern indistinguishable from the untransfected control cells. These results indicate that VP4 does not seem to participate in the ER-budding of the particles, or in the membrane removing of the transient lipid layer of the immature viral particles.

The established methodology opens the possibility to study other rotavirus genes and also to carry out genetic reverse studies in other *Reoviridae* family members.

INTRODUCCION

Los rotavirus representan un problema de salud pública por ser el principal agente causal de las gastroenteritis severa en niños menores de 3 años (86). El entendimiento de los mecanismos moleculares de cada etapa de la infección viral, como son la entrada, la transcripción, la replicación y la morfogénesis; debe ayudar definitivamente al desarrollo de estrategias antivirales profilácticas y terapéuticas.

El estudio de los virus, independientemente de la importancia como agentes patógenos en humanos y animales, también nos ha ayudado a comprender mejor el funcionamiento de los procesos celulares relacionados con el flujo de la expresión genética, ya que los virus explotan eficientemente esos sistemas celulares. Los virus pueden ser visualizados como un resumen de un sistema genético complejo, dado que su aparente sencillez permite relacionar más fácilmente al fenotipo con el genotipo.

Los virus ejemplifican y han permitido aprender de los cinco aspectos importante de las etapas del flujo de la información genética; desde la replicación, la transcripción y la traducción, hasta las modificaciones postraduccionales y la función de proteínas celulares.

En el caso de los rotavirus dos de sus proteínas, NSP4 y VP7, son residentes del retículo endoplásmico (RE) por lo que se han estudiado como modelos del direccionamiento intracelular de polipéptidos y así mismo se han visualizado a los rotavirus como herramientas para entender las funciones del RE, así como para estudiar las interacciones entre el virus y el tracto gastrointestinal de huésped (45)

Generalidades de los rotavirus

Descripción:

Las características principales de los rotavirus se describen a continuación (45):

Los rotavirus son virus de RNA que se replican en el citoplasma y se clasifican como un género dentro de la familia Reoviridae.

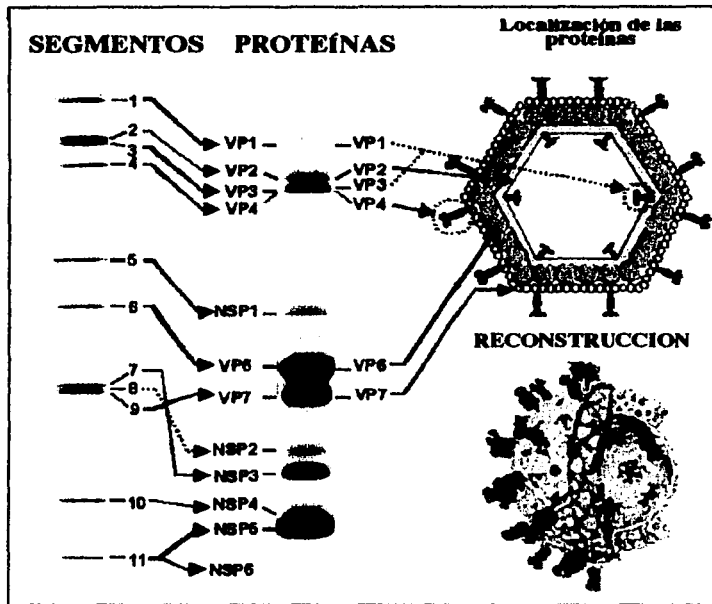


Figura 1. Organización estructural y génica de los rotavirus. Se muestran los 11 segmentos del genoma y las correspondientes proteínas codificadas, con su peso molecular relativo y su localización en la partícula (proteínas estructurales). La capa más interna, núcleo viral o "core" (en verde), está formada de la proteína VP2, la capa intermedia (en azul) constituida por la proteína VP6 y la capa más externa contiene tanto a la proteína VP7 (en amarillo) como a las espiquetas de la proteína VP4 (en rojo).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El genoma de los rotavirus consta de 11 segmentos de RNA_{dc}, de los cuales 10 son monocistrónicos y solo el segmento 11 codifica para dos proteínas (113). Los segmentos del genoma de los rotavirus codifican tanto para proteínas estructurales (VPs), que se encuentran en las partículas virales, como para proteínas no estructurales (NSPs) que están presentes sólo en las células infectadas. Existen 6 proteínas estructurales (VP1, 2, 3, 4, 6 y 7) y 6 proteínas no estructurales (NSP1 a NSP6) (46, 113). Las proteínas virales experimentan modificaciones postraduccionales que incluyen, glicosilaciones, miristilaciones, fosforilaciones y cortes proteolíticos (por ejemplo, la proteína VP4 genera VP5 y VP8 al ser cortada con tripsina).

La partícula infecciosa (virión) tiene una simetría icosaédrica de diámetro entre 65-75 nm, con tres capas proteicas concéntricas sin envoltura de lípidos (**Figura 1**). La capa interna o núcleo está constituida por 120 moléculas de la proteína VP2, que incluye al genoma junto con 12 moléculas de cada una de las proteínas VP1 y VP3; la capa intermedia está formada de 260 trímeros de la proteína VP6, mientras que la capa externa está constituida por 260 trímeros de la proteína VP7 que dan una apariencia lisa al virión y de la que sobresalen 60 púas o espículas constituidas por dímeros de la proteína VP4 (**Figura 1**).

Estudio de la función de los genes de rotavirus

En los rotavirus no se dispone actualmente de un sistema de genética reversa que permita mutagenizar y evaluar la función de cada una de las proteínas virales y de sus dominios o motivos de manera precisa. Las funciones de las proteínas virales se han estudiado principalmente por ensayos *in vitro*, por la selección de variantes naturales, por el aislamiento de virus mutantes termosensibles y por la generación de virus rearreglantes. En este último caso, el cual es una herramienta poderosa para estudiar la genética de virus con genomas segmentados, se mezclan por infección simultánea dos cepas con genotipos diferentes, una de las cuales porta el fenotipo de interés, la progenie viral resultante de esta mezcla se tamiza aislando y caracterizando clones virales (a través de ensayo en placa), hasta identificar el segmento viral (un gen) que siempre cosegregue con el fenotipo bajo estudio. A continuación se dan algunos ejemplos de las metodologías y las funciones asignadas a los genes de rotavirus.

La caracterización de variantes naturales han mostrado por ejemplo, que al parecer la proteína NSP1, no es esencial para la replicación viral (75, 134), por lo que la verdadera función de esta proteína en el ciclo viral queda por establecerse.

La proteína VP1 es considerada una RNA polimerasa dependiente de RNA (RNAPol o RNAPol, se usará preferentemente la segunda abreviatura más corta porque todas las RNA polimerasas descritas en esta tesis son dependientes de RNA) por tener motivos de RNA polimerasa en su secuencia (121), por su afinidad por nucleótidos (177) y también por ser un componente de los complejos intermediarios de replicación (RIs) (55, 195). Se sabe también que NSP1 se une al extremo 3' de los RNAMs de rotavirus (139). Estas actividades fueron determinadas por ensayos *in vitro*.

Los estudios con mutantes termosensibles indicaron que los virus con deficiencias en VP1 y VP3 no sintetizan RNAMs, mientras que aquellos mutantes en VP2 y VP6 no sintetizan RNAdc (26, 60, 107, 108, 152).

Por otro lado, las funciones de la proteína no-estructural NSP3, como su capacidad de unirse al extremo 3' de los RNAMs virales en la secuencia consenso UGUGACC y la de unirse al factor de traducción eIF4G, provienen en su mayoría de estudios *in vitro* y también por el sistema de dos híbridos en levadura (112, 145, 146, 148, 149). Del gen que codifica para NSP3 no existen ni mutantes termosensibles, ni variantes naturales que informen sobre sus funciones en el ciclo de los rotavirus, pero se cree que muy probablemente es la proteína que desvía la maquinaria de traducción celular hacia la de los RNAMs virales, con el consecuente abatimiento de la traducción de los RNAMs celulares.

Las funciones de algunas otras proteínas virales en su mayoría, se han deducido por su distribución en la célula infectada, su localización dentro de la partícula viral y por ensayos *in vitro* con componentes virales aislados.

Partículas virales

La apariencia de las partículas infecciosas al microscopio electrónico es de una rueda de carreta con rayos cortos y un anillo exterior bien definido y liso (51), de hecho los rotavirus reciben su nombre por esta característica (del latín *rota*=rueda). Cuando se purifican los virus a partir de un cultivo celular infectado mediante gradientes isopícnicos de CsCl, se distinguen dos tipos de partículas: de doble capa o

DLPs (Double-Layered Particles) formando una banda inferior, y una banda superior que corresponde a las partículas completas o TLPs (Triple-Layered Particles) (Figuras 14 y 2A del artículo). Las partículas DLPs con una densidad de 1.38g/cm^3 (172) tienen una apariencia rugosa al microscopio electrónico que contrasta con la apariencia lisa de las partículas TLPs (17) y que tienen una densidad de 1.36g/cm^3 .

Las DLPs no son infecciosas, ya que la infectividad de los rotavirus depende de la presencia de la capa externa (TLPs). El tratamiento con agentes quelantes de calcio (EDTA y EGTA), que remueven la capa externa, resulta en la formación de las DLPs con la consecuente pérdida de la infectividad (17, 47).

Los estudios estructurales de los rotavirus empleando criomicroscopía electrónica y análisis de imágenes, han permitido visualizar cada una de las tres capas en los rotavirus de manera tridimensional (Figura 1). De manera específica, la mayoría de las características estructurales de la proteína VP4 de la capa externa se han obtenido comparando imágenes de partículas virales completas y partículas que carecen de VP4 a resoluciones alrededor de 26 \AA (163, 188). Las partículas sin VP4 se pueden producir experimentalmente tratando a las partículas completas con pH alcalino (5, 188) o por la generación de virus rearreglantes que pierden la VP4 durante la purificación por gradientes de CsCl, como en el caso del rearreglante de VP4 de la cepa bovina B223 sobre el fondo genético de la cepa de simio SA11-4F (27, 163).

También se han logrado producir partículas semejantes a las partículas virales llamadas VLPs (Virus-Like Particles), a partir de únicamente proteínas estructurales de rotavirus, indicando que las proteínas estructurales *per se* tienen la propiedad de autoensamblarse. Expresando a las proteínas estructurales en células de insecto transformadas con vectores de expresión recombinantes, se han generado VLPs en las siguientes combinaciones: VP2, VP2/VP6, VP2/VP4/VP6, VP2/VP6/VP7 y VP2/VP4/VP6/VP7 (35). Con las proteínas estructurales de la capa externa (VP4 y VP7) purificadas, se han logrado reconstituir *in vitro* TLPs infecciosas a partir de núcleos virales o de DLPs, aún con proteínas de diferentes cepas, en un proceso denominado transcapsidación (28, 29). El ensamble de la tercera capa protéica de una cepa sobre las VLPs de otra cepa también se ha podido realizar *in vivo* en células de insecto (91).

Ciclo replicativo de los rotavirus

Como se muestra en la **Figura 2**, la replicación viral inicia con la pérdida de la capa externa (proteínas VP4 y VP7) produciendo DLPs, con la consecuente activación de la transcriptasa viral asociada a estas partículas de doble capa. Los once RNAs virales se transcriben a partir de los segmentos de RNAdc, traduciendo a su respectiva proteína en ribosomas libres en el citoplasma (para la mayoría de las proteínas) o asociados al retículo endoplásmico para las proteínas NSP4 y VP7. A partir de este momento algunos RNAs son dirigidos por proteínas virales (sin descartar la participación de proteínas celulares) hacia la ruta de la morfogénesis viral, mientras que otros son traducidos. Las nuevas partículas virales se ensamblan hasta partículas DLPs en inclusiones citoplásmicas grandes denominadas viroplasma. Durante este proceso los RNAs son convertidos en RNAdc genómico. Las DLPs maduran a TLPs gemando de los viroplasma al RE adyacente, la membrana del cual se encuentra modificada con las glicoproteínas virales NSP4 y VP7. Como resultado de la gemación, las partículas se envuelven en la membrana del RE (que incluye las proteínas virales) formando partículas intermediarias que dan lugar a las TLPs en el lumen del RE, por la remoción de la membrana y el ensamble de la tercera capa proteica. Finalmente los viriones se acumulan en el lumen del RE hasta ser liberados por la lisis celular. Se ha propuesto una ruta de liberación de partículas virales para células polarizadas que ocurre en ausencia de lisis viral, la cual se abordará adelante en la sección de morfogénesis viral.

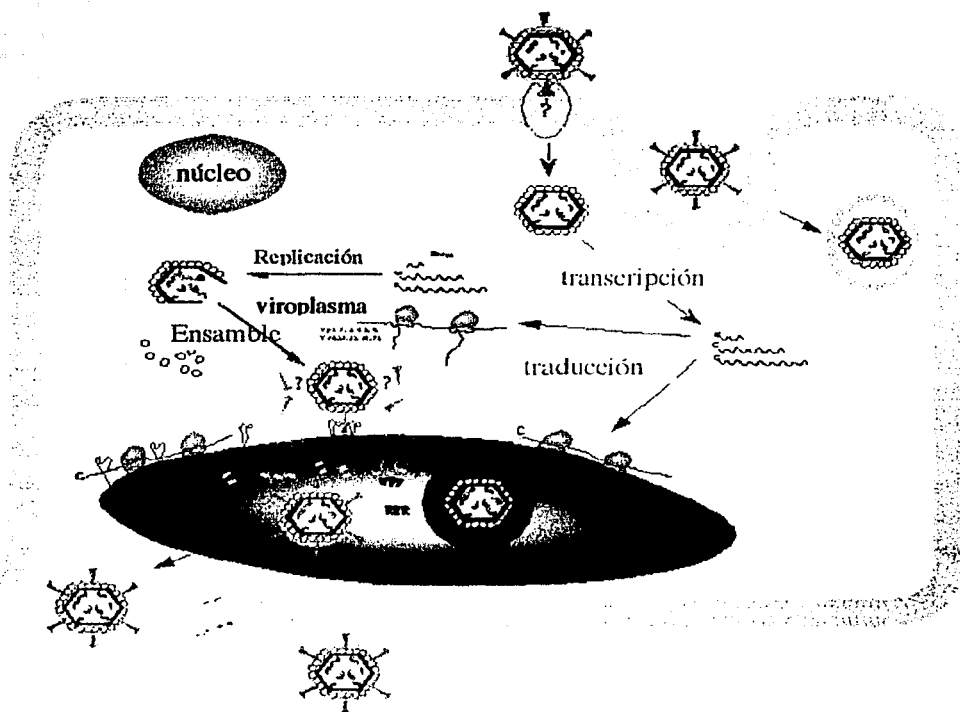


Figura 2. Ciclo de replicación de los rotavirus. Se muestran las principales etapas del ciclo: la penetración a través de la membrana celular, la transcripción, la traducción, así como la morfogénesis viral que ocurren en el citoplasma celular y el RE. La morfogénesis viral inicia en los viroplastos con el ensamblaje de DLPs simultáneamente a la formación del RNA_g genómico y continúa con la gemación de las DLPs al lumen del RE formando las partículas intermedias con membrana de lípidos. La maduración de las partículas virales se genera por la remoción simultánea de la membrana de las partículas intermedias y el ensamblaje de la tercera capa proteica. Los virus maduros se acumulan hasta su liberación mediante la lisis celular, provocada por la misma infección viral. Ilustración creada por el M en C. Fernando Hernández.

Morfogénesis de los rotavirus

Para los fines de este estudio es de particular interés la morfogénesis de los rotavirus en el retículo endoplásmico, que esta determinada por tres proteínas de rotavirus; dos estructurales, VP4 y VP7, y una no estructural, NSP4. A continuación se describen las principales características de cada una de las proteínas referidas, así como la morfogénesis viral en mayor detalle.

Proteínas virales involucradas en las etapas finales de la morfogénesis viral

La proteína estructural VP4

La proteína VP4 es una proteína de 776 aa que no se glicosila, es reconocida como la hemaglutinina viral (83). Es un antígeno de neutralización (106) y también es el determinante de la virulencia (52, 62, 133). Esta proteína está involucrada en la unión a las células (156) a través de receptores celulares y en la penetración del virus al citoplasma celular (105, 194).

Los dímeros de la proteína VP4 forman las 60 espículas de aproximadamente 200Å de longitud, que sobresalen de la superficie del virus 120 Å, como se muestra en la **Figura 3**. La cabeza de la espícula es bilobada y unida a un cuerpo cuadrado formado por dos bastones. La base de anclaje con diámetro de 70-85 Å, despliega una pseudo-simetría de 6 lados (163, 188). Cuando los rotavirus se tratan con tripsina aumenta se aumenta su infectividad (44) y la proteína VP4 genera dos polipéptidos, VP5 y VP8 de 60 y 28 KDa respectivamente. La cabeza de VP4 la constituye el polipéptido VP8, mientras que el cuerpo esta compuesto por una porción de VP8 y por el polipéptido VP5 (175) (**Figura 3**).

Se ha sugerido que la presencia del dominio hidrofóbico en VP4 (**Figura 4**), con alta homología al dominio de fusión de membranas de los alfavirus (106), es el responsable de la capacidad de interactuar y permeabilizar membranas que poseen los rotavirus (40, 128, 157). Estas características hacen de VP4 una proteína potencialmente importante, no sólo para la entrada del virus a las células huésped,

sino aparentemente también para la morfogénesis viral en el retículo endoplásmico (45), como se describe más adelante. En ambos procesos, sus características facilitarían la transferencia de partículas a través de las membranas (175).

La proteína VP4 parece tener además una función estructural que implica mantener el registro geométrico preciso entre las capas interna y la externa, ya que puede interactuar con dos moléculas de VP7 en la capa externa y con seis moléculas de VP6 en la capa interna (45).

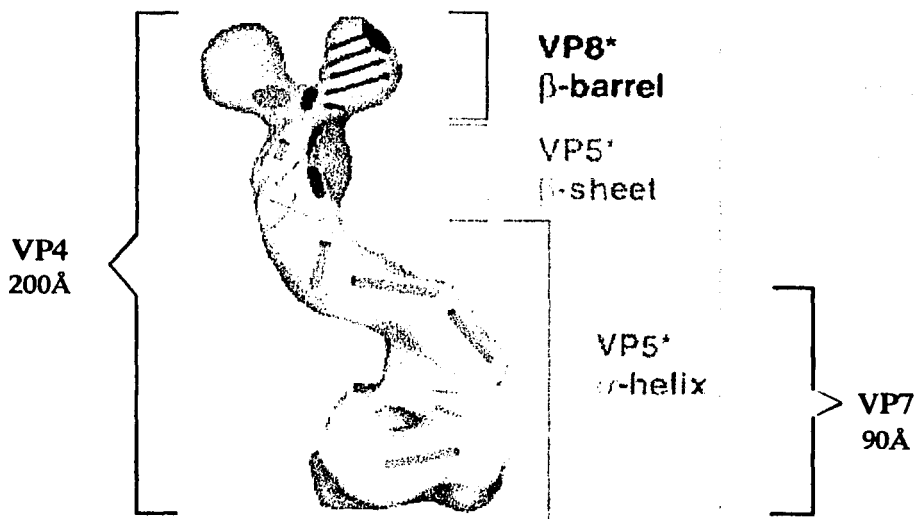


Figura 3. Modelo esquemático de la topología de VP4. Se muestra un dímero de VP4; VP8 (en rojo) y VP5 (en verde). Nótese la base globular amplia de ~ 70 -85 Å de diámetro que se inserta en los canales de tipo II de ~ 55 Å de diámetro, presentes en la capa de proteínas formada por VP7. Se indican las longitudes interna y externa en la tercera capa, para el homodímero de VP4. Tomado de Tihova *et al* (175).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

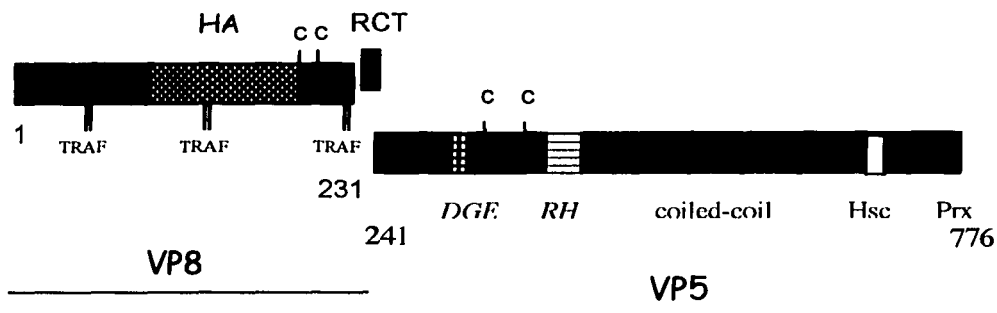


Figura 4. Representación esquemática de la proteína VP4. Se muestran sus principales dominios; VP8 y VP5 originados por proteólisis con tripsina, así como los motivos que han sido mapeados. **HA:** dominio de hemaglutinación 93-208 (53, 78, 106). **RCT:** región de corte con tripsina Arg 231,241,247 (7). **RH:** región hidrofóbica de permeabilización-fusión de membranas (390-401) (106, 111). **TRAF:** Elementos de unión a TRAF 68,157,226 (95). **Prx:** Señal de dirección a peroxisomas 774-776 (123). **DGE:** sitio de unión a la integrina $\alpha 2\beta 1$ p 303-310 (34, 72, 104, 193). **Hsc:** dominio de unión a hsc70 p642-659 (192).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La proteína estructural VP7

Constituye la segunda proteína más abundante del virión, después de la proteína VP6, y es una proteína que experimenta N-glicosilaciones mientras se inserta en la membrana del retículo endoplásmico, dirigida por una secuencia señal en el extremo amino (81). Esta proteína posee además dos señales para retención en el retículo endoplásmico, diferentes a la secuencia KDEL de algunas proteínas del RE (127), entre los aminoácidos 51-61 y 61-111 (183). Se han encontrado tres aminoácidos críticos (ITG) en el extremo amino terminal para la retención de VP7 en el RE (109).

Existen dos poblaciones de VP7, una que sólo se encuentra en las partículas maduras y otra que está en el RE con disposición luminal, al parecer en forma dimérica, la cual parece ser precursor de la primera (82, 110). Para que VP7 se ensamble en las partículas virales también parece ser necesario que tenga enlaces disulfuro apropiados (168) y que haya una elevada concentración de calcio en el RE (150, 151).

Se ha propuesto que la VP7 madura en un compartimiento intermediario entre el RE y el aparato de Golgi, y que la VP7 procesada a manosa 6, a partir de manosa 9, regresa al RE por sus singular par de señales de retención. Lo anterior lo hace de una manera similar a lo que ocurre con las proteínas con la señal KDEL, las cuales regresan al RE desde las regiones pre-Golgi o cis-Golgi (127, 142).

La proteína no estructural NSP4

Es la única proteína no estructural que se traduce en ribosomas asociados al RE y que se modifica por dos N-glicosilaciones en el extremo amino, para dar la forma madura de 28KDa (81). La secuencia para retención en el RE no se conoce, pero se sabe que no es la típica KDEL de las proteínas celulares ni el ITG de VP7; los dominios hidrofóbicos del extremo amino parecen ser completamente los responsables de la retención (25).

La proteína NSP4 en la membrana del RE se encuentra predominantemente en forma de tetrámeros (110). El extremo amino de NSP4 es intramembranal mientras que el extremo carboxilo tiene una disposición citoplásmica (25). NSP4 es reconocida como el receptor en el RE de las DLPs, lo cual se lleva a cabo a través de la interacción de la partícula viral con el dominio citoplásmico (9).

La proteína NSP4 posee un dominio de unión a VP4, entre los aa 112-146 (10), y otro entre los aa 161-175, que une a VP6 (DLPs) (9, 173). Los monómeros de proteínas NSP4, VP4 y VP7 se han aislado en forma de un complejo heterotrimérico, que por contener a estas tres proteínas, pudiera constituir el receptor funcional de las partículas subvirales (DLPs) en la membrana del RE (110).

Morfogénesis en el citoplasma

Esta sección sólo hace referencia a la parte del ciclo de replicación de los rotavirus posterior a las fases de adsorción, penetración y desnudamiento, sin hacer incapié en los mecanismos involucrados en estos pasos que ha sido revisados ampliamente por Arias *et al* 2002 (6). El conocimiento acumulado sobre la morfogénesis de los rotavirus que a continuación se expone, se ha derivado de los estudios en células epiteliales del riñón de mono (MA104).

La morfogénesis de los rotavirus inicia cuando algunos de los RNAm virales transcritos a partir de las DLPs son captados por las proteínas virales (y tal vez celulares) que los convertirán en RNAdc genómico. La localización celular de la primera interacción del RNAm con esas proteínas no se conoce.

Las nuevas partículas virales se comienzan a ensamblar como intermediarios de replicación (RIs), llamados así por contar con la actividad de replicasa (RNA polimerasa dependiente de RNA) (55, 140). Estos RIs llevan a cabo la síntesis del RNA viral de doble cadena tomando como molde los RNAm virales (114). La formación de los RIs y la síntesis del RNAdc genómico tienen lugar en los viroplasmos (144), que constituyen estructuras citoplásmicas electrodensas cuando son observadas al microscopio electrónico, y están formados por una gran cantidad de proteínas estructurales y no estructurales, así como de RNA viral.

Los intermediarios de replicación se forman a partir de un complejo inicial denominado precoreRI, que incluye a las proteínas VP1, VP3, NSP1 y NSP3, a partir del que se ensambla otro complejo que ya incluye las proteínas del núcleo viral llamado coreRI, constituido de VP1, VP2 y VP3 junto con las proteínas noestructurales NSP2 y NSP5. Finalmente se conforma el complejo llamado VP6RI con las proteínas VP1, VP2, VP3, VP6 y NSP2, que da lugar a las DLPs formadas con las proteínas VP1, VP2, VP3 y VP6 (55, 140).

Las proteínas no estructurales NSP2 y NSP5, sintetizadas simultáneamente en células en cultivo a partir de vectores de expresión, generan estructuras tipo-viroplasma (48), por lo que se infiere que son importantes en esta etapa de la morfogénesis, donde deben existir contactos específicos proteína-proteína para convertir a los RNAs virales en RNAdc genómico, lo que ocurre mientras se ensamblan las partículas subvirales (55). Las partículas VLPs (VP1, VP2 y VP6) ensambladas en células de insecto, en ensayos *in vitro*, tienen actividad de replicasa y pueden usar como molde a un RNAm exógeno para convertirlo en RNAdc, sin la aparente participación de proteínas no estructurales (30). Juntos, estos hallazgos sugieren que las NSPs pueden aumentar la eficiencia de replicación de las partículas subvirales, reclutar o mover otras proteínas virales de sus sitios de síntesis hacia el viroplasma o facilitar el movimiento de las partículas virales nacientes hacia la membrana del RE (45).

Las proteínas no estructurales pueden intervenir en la introducción de RNAm al interior de las partículas en formación que están vacías, en mantener el balance entre la traducción y la replicación de los RNAs virales, y también podrían actuar como chaperonas en todos los eventos de la morfogénesis viral.

Maduración de los rotavirus en el Retículo Endoplásmico

Las DLPs ensambladas en los viroplasma son reconocidas por un receptor presente en la membrana del RE (formado aparentemente por las proteínas NSP4, VP4 y VP7), que promueve la gemación de las DLPs hacia el lumen del RE. Durante la gemación adquieren una membrana de lípidos del RE que contiene a las proteínas NSP4, VP4 y VP7. Por un mecanismo desconocido las DLPs pierden la envoltura transitoria de lípidos junto con la proteína NSP4, y selectivamente retienen a las proteínas VP4 y VP7 para formar los virus maduros que se acumulan en el lumen del RE hasta que ocurre la lisis celular.

Se debe recalcar que durante toda la infección viral se incrementan las concentraciones de Ca^{2+} tanto en el citoplasma como en el RE (118, 119), lo que parece ser una condición necesaria para la morfogénesis.

Entonces, existen dos etapas importantes en la maduración de los rotavirus en el RE: la gemación y la exclusión de la envoltura, las cuales son características particulares de la morfogénesis de estos virus. Se ha calculado, por estudios cinéticos de la incorporación de VP7 en las partículas virales, que la gemación y el ensamble de la tercera capa ocurren en un periodo aproximado de 15 min (82).

Gemación (traslocación)

Las observaciones al microscopio electrónico (ME) de células infectadas con rotavirus muestran que las DLPs emergen de los viroplasmias y geman hacia el lumen del RE, envolviéndose con la membrana del RE (**Figura 3** del artículo). De tal manera, la gemación involucra dos componentes, las DLPs formadas en los viroplasmias y las proteínas del complejo heterotrimérico en la membrana del RE, que incluye a las proteínas estructurales de la capa externa VP4 y VP7, así como la proteína no estructural NSP4. El complejo heterotrimérico VP4-NSP4-VP7, se ha propuesto como el receptor que determina que las DLPs gemen hacia el interior del RE, aunque el mecanismo exacto aún se desconoce.

Exclusión de la envoltura del intermediario

Se ha propuesto que la maduración viral a la forma infecciosa final implica la remoción coordinada de la membrana de lípidos junto con la proteína NSP4, y el ensamble de la tercera capa constituida por las proteínas VP7 y VP4 sobre las DLPs (45). Se desconoce el mecanismo preciso por el cual se pierde la envoltura lipídica y se ensambla la capa externa, pero se sabe que este proceso es dependiente de una alta concentración de calcio (orden milimolar) en el lumen del RE, provocada probablemente por algunas proteínas virales. Se ha postulado que la alta concentración de calcio permite la glicosilación correcta de VP7 y de NSP4 para formar los heterotrimeros, y que también promueve la remoción de la membrana transitoria (119, 151).

Actualmente existen cuatro diferentes tratamientos por los cuales se puede detener la morfogénesis viral a nivel de las partículas intermediarias envueltas en lípidos:

1. Tratando las células infectadas con la droga tunicamicina, un inhibidor de N-glicosilación, que evita que se glicosilen las proteínas NSP4 y VP7 en el RE (151). La identificación de una variante viral que produce una VP7 no glicosilada que no afecta la remoción de la capa de lípidos, indica que solo la glicosilación de NSP4, pero no la de VP7, es esencial para tal efecto (143).
2. Agotando las reservas de calcio en el RE, por la aplicación de tapsigargina (sesquiterpeno lactona derivada de *Thapsia garganica*), que es un inhibidor de la ATPasa de Ca^{2+} del RE, responsable del bombeo de calcio hacia el lumen. La concentración disminuída de Ca^{2+} provocada por la tapsigargina repercute en que la VP7 ya no se asocia al heterodímero VP4-NSP4 (151) y que sufra un cambio conformacional, evidenciado por la falta de reconocimiento por un anticuerpo monoclonal (119). Por la similitud de los efectos de la tapsigargina y la tunicamicina, se ha postulado que al agotar el Ca^{2+} en el RE se afecta la glicosilación de las proteínas NSP4 y VP7, impidiendo el ensamble de la tercera capa y la remoción de la membrana lipídica (119).
3. Produciendo virus en medio libre de calcio, usando EGTA o el ionóforo de calcio A23187, se tiene el mismo efecto (151, 161), indicando la dependencia de una elevada concentración de Ca^{2+} en el RE y/o de la glicosilación de NSP4 para la exclusión de la envoltura. Shahrabadi *et al* (161), sólo encontraron DLPs después de la purificación de partículas por gradiente de CsCl. Posteriormente se demostró por ME que en ausencia de calcio, VP7 no se mantuvo incorporada a la membrana del RE y mas bien se distribuyó en el citoplasma (3).
4. El uso de Brefeldina A, que inhibe el transporte de proteínas fuera del RE. Como en el caso de la enzima manosidasa II, propia del aparato de Golgi, la cual fue retenida erróneamente en el RE. En esta condición VP7 fue incorrectamente glicosilada por esa enzima. Por su parte la proteína NSP4, aunque sus carbohidratos fueron procesados de una forma diferente, no fue sustrato de la manosidasa II, sugiriendo que las dos proteínas se procesan en compartimientos diferentes (120).

Los tratamientos descritos, afectaron la glicosilación de las proteínas virales pero no impidieron que las DLPs gemaran hacia el RE, por lo que no se puede asociar este evento a una alteración en cualquiera de las tres proteínas involucradas (NSP4, VP4 y VP7). Mas bien los resultados parecen sugerir que es suficiente la presencia de las tres proteínas en la membrana del RE para llevar a cabo la gemación de las DLPs. En cuanto a la remoción de la envoltura, queda claro que ni la incorrecta glicosilación de NSP4, ni la no glicosilación de VP7 detienen la remoción de los lípidos, esto solo se logra con la glicosilación incorrecta en VP7 (81). Es posible que el calcio estabilice o module el plegamiento, la compartimentalización o la retención de las proteínas glicosiladas para el subsecuente ensamble en las partículas (3, 45). La producción de partículas infecciosas en cambio, fue afectada por todos los tratamientos mencionados, demostrando que esta etapa requiere la presencia de las proteínas así como su correcta glicosilación.

Topología de las proteínas virales en las partículas intermediarias con membrana lipídica

El complejo ternario NSP4-VP4-VP7 en la membrana del RE (110) también esta representado en las partículas intermediarias envueltas en el lumen del RE, después de la gemación de las DLPs. Sin embargo, en estas partículas, la disposición de las proteínas virales cambia, como se describe a continuación y se observa en la **Figura 5**.

En la membrana del RE, NSP4 tiene el extremo carboxilo en disposición citoplásmica, lo que constituye el dominio interactuante del receptor con las DLPs (9, 110, 173). La proteína VP4 en su totalidad se encuentra en el citoplasma, puesto que no es una proteína transmembranal, mientras que VP7 esta orientada hacia el lumen del RE.

En las partículas intermediarias con lípidos, las tres proteínas tienden a localizarse al interior de los lípidos; VP7 es completamente interna, VP4 tiene algunas regiones que sobresalen de la partícula, mientras que NSP4 tiene sólo una región que sobresale de la partícula (150). Para NSP4 y VP4 se esperaría una localización externa, no así para VP7 la cual se esperaría en una localización interna. Esta tendencia a internalizarse en los lípidos puede reflejar el proceso de ensamble de la tercera capa.

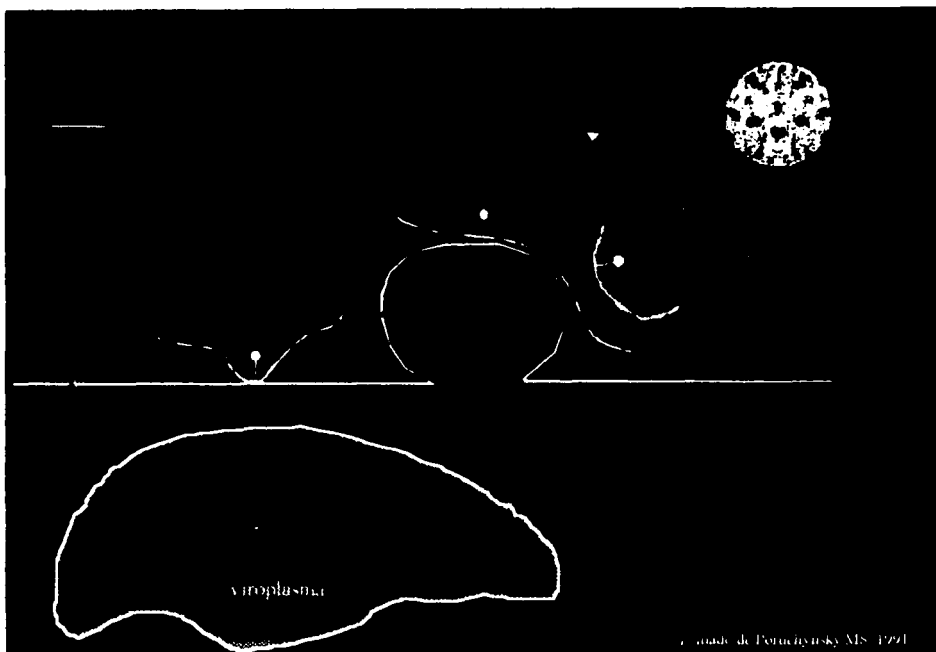


Figura 5. Topología de las proteínas NSP4, VP4 y VP7 de rotavirus en la membrana del RE y en las partículas intermediarias con membrana lipídica dentro del lumen del RE. La remoción de la membrana, la exclusión de NSP4 y el ensamble de la tercera capa, generan los viriones infecciosos. Sólo se muestran los monómeros de las proteínas . Tomado de Pourochynsky *et al* 1991 (150).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Morfogénesis de los rotavirus en células Caco-2

Se ha propuesto que existe una ruta diferente de ensamble y maduración de los rotavirus en la línea celular Caco-2. Esta línea celular es derivada de un cáncer de colon humano y exhibe un fenotipo bien diferenciado (células polarizadas) cuando se mantiene en cultivo prolongado.

Las diferencias básicas con respecto a la morfogénesis de rotavirus en las células MA104 son:

1. La liberación del virus es vectorial, por medio de vesículas que probablemente se fusionan con la membrana apical y liberan a los viriones al medio extracelular en ausencia de lisis celular. Esta ruta de tráfico vesicular no pasa por el aparato de Golgi ni por los lisosomas (80).
2. Se propone que la proteína VP4 dirige el ensamble de las partículas virales usando los microdominios lipídicos denominados "rafts" como plataforma, en la región apical, y no en el retículo endoplásmico (159).

De acuerdo a esta propuesta, los rotavirus no maduran en el retículo endoplásmico, pero sí en otro sistema de membrana que no está ni en la ruta del aparato de Golgi ni de los lisosomas, pero cercano a la membrana apical. En estos casos la proteína VP4 tendría la capacidad de interactuar directamente con los lípidos de los rafts (no en el RE) y de ser transportada con ellos hacia la región apical, donde después se pueden incorporar las DLPs junto con NSP4. Este modelo queda por confirmarse, y aunque la liberación de los virus es realmente diferente en Caco-2 que en MA104, la presencia, tanto de intermediarios envueltos, como de partículas sin envoltura en el RE, hace pensar que la morfogénesis es similar en ambas líneas celulares.

La "Interferencia por RNA" (RNAi)

Recientemente se ha empezado a utilizar una metodología que ha resultado muy poderosa para estudiar la función de los genes que codifican para proteínas, basada en el silenciamiento postranscripcional de los RNAs. Esta metodología explota una maquinaria intracelular que al parecer poseen todos los organismos eucariontes, que se activa por la presencia de RNAdc que debe tener una secuencia idéntica al gen (su RNAm) que se ha de inhibir.

Esta respuesta biológica a RNAdc media la resistencia a los ácidos nucleicos parasitos 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 (70).

El nombre de "interferencia" se debe a que en el gusano *Caenorabditis elegans*, donde se descubrió el mecanismo, se interrumpió la expresión del gen *unc-22* a nivel de la traducción, sin alterar su transcripción (50, 124) y como el RNAdc fue el "gatillo" que disparó esta respuesta celular, se le denominó "interferencia por RNA" o de manera abreviada "RNAi" (162). El efecto interferente del RNA se debe a la degradación de los RNA mensajeros (RNAm) que son idénticos en secuencia al RNAdc que activó la respuesta(124).

La RNAi descrita inicialmente en *C. elegans*, esta relacionada mecanísticamente a otros fenómenos como son la cosupresión, el silenciamiento genético postranscripcional (PTGS) y el silenciamiento postranscripcional inducido por virus (VIGS), descritos previamente en las plantas (102, 129, 158, 178), e igualmente al que se conoce como "quelling" (supresión) en el hongo *Neurospora* (33) y en las algas *Dictyostelium* y *Chlamydomonas* (54, 187); todos estos mecanismos se conjuntan en una respuesta más general denominada "silenciamiento por RNA". El hecho de que este mecanismo se encuentre en diversos organismos eucariontes, desde los protistas, hongos, plantas, invertebrados y hasta mamíferos, indica que es un mecanismo ancestral que ya estaba presente antes de la divergencia entre animales y plantas, altamente conservado conservado evolutivamente. Por otra parte parece representar una innovación en los eucariontes, ya que no se ha encontrado esta respuesta en los procariontes (191).

El RNA de doble cadena es la molécula interferente

La maquinaria de RNAi usa la información presente en la secuencia del RNAdc como guía para degradar el RNA mensajero que comparta esa secuencia. De esta manera la RNAi es altamente específica, ya que sólo afecta la expresión de los genes que tengan una secuencia idéntica al RNAdc que inició el proceso. Las moléculas de RNAdc son percibidas por la célula como parte de eventos de origen extraño, que normalmente no existen en las células. Aunque las tres clases de RNAs celulares más abundantes: RNA ribosomal, RNA de transferencia y RNA mensajero, forman estructuras secundarias en las que existen regiones de doble cadena, por alguna razón desconocida estas regiones son ignoradas por la maquinaria de silenciamiento celular. En todos los organismos donde se ha descrito la interferencia de RNA, el RNAdc representa la única llave de acceso hacia la respuesta interferente. Si algunas moléculas son RNA de cadena sencilla, el sistema puede convertirlas a RNAdc.

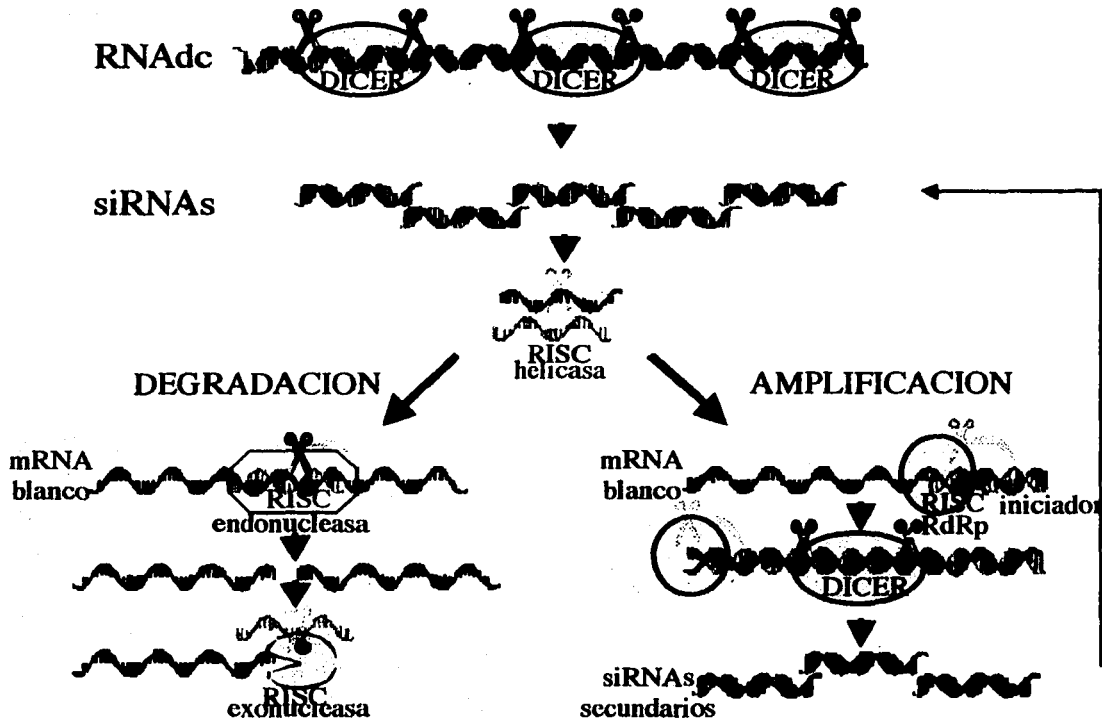


Figura 6. Modelo general de la RNAi en organismos eucariontes. El "gatillo" que dispara la RNAi es el RNAdc, el cual es reconocido y segmentado a RNAs interferentes pequeños (siRNAs) por la ribonucleasa Dicer. Los siRNAs generados se incorporan al complejo RISC y se separan sus dos hebras por la actividad de helicasa del complejo. El complejo RISC reconoce al RNAm blanco, tomando como guía a la cadena negativa del siRNA (en rojo), pudiendo entonces suceder dos eventos. En el primero, el RNAm se corta en medio de la doble cadena siRNA-RNAm y el RNA cortado es degradado completamente por una actividad exonucleasa. En el segundo caso, la hebra antisentido (en rojo) puede servir como iniciador para la síntesis de la cadena complementaria por una RNAPol, generando un nuevo RNAdc que la enzima Dicer convierte en siRNAs secundarios. Estos siRNAs entran nuevamente en la ruta de RNAi, amplificando la señal interferente. En ambos casos se inactiva el RNAm evitando su traducción. Se señalan las actividades enzimáticas del complejo RISC en cada paso.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Mecanismo de interferencia

Como se observa en la Figura 6, el proceso de RNAi se inicia cuando una RNasa de tipo III llamada Dicer (14), convierte al RNAdc ("gatillo") en fragmentos ("efectores") de doble cadena de 21 a 23 pares de bases con 2 nucleótidos sobresaliendo en el extremo 3', conocidos como RNAs interferentes pequeños o siRNAs (66, 190). Estos siRNAs son incorporados en un complejo protéico llamado RISC (por sus siglas en inglés: RNA Induced Silencing Complex) en el que son convertidos a RNA de cadena sencilla por acción de una helicasa (67, 132). En este punto los siRNAs de cadena sencilla son inestables por sí mismos y son degradados, a menos que reconozcan un RNA blanco, esta inestabilidad provee un filtro rápido de especificidad (147). El segundo paso es el reconocimiento del RNA blanco de cadena sencilla, mediante la cadena negativa de los siRNAs que sirve como guía presumiblemente por medio de interacciones tipo Watson-Crick (67).

El RNA blanco apareado con el siRNAs puede seguir dos destinos: uno de amplificación de la señal interferente, en el cual el RNAm blanco es convertido a RNAdc mediante una RNapol (130), que usa a la cadena negativa del siRNA como iniciador para sintetizar la cadena complementaria (103). Este RNAdc es cortado nuevamente por Dicer para generar siRNAs ahora denominados "secundarios", en un proceso que se le nombra "RNAi transitivo", término que se refiere al movimiento de la señal de silenciamiento a lo largo de un gen particular (103, 165). En la mosca y en los mamíferos no parece suceder tal amplificación (56, 68, 73, 132, 190). En *C. elegans* el efecto transitivo sólo es en dirección 3'-5', mientras que en plantas es hacia ambas direcciones 5'-3' y 3'-5' (49).

En la otra opción que parece ser la única en células somáticas de insectos y de vertebrados (160), el RNA blanco en el duplex siRNA-RNAm sufre un corte por una endoribonucleasa del complejo RISC, diferente a Dicer (67, 68, 132) en aproximadamente la mitad del duplex (43). Por acción de una exoribonucleasa también en el complejo RISC, tipo Mut-7 de *C. elegans* (89), el RNA se degrada totalmente. Como el complejo RISC es reusado en varios ciclos de degradación, también en este caso se puede hablar de una amplificación de la RNAi (76). En los demás eucariontes inferiores, el RNA cortado también puede ser convertido a RNAdc por una RNapol esta vez independiente de iniciador y generar siRNAs secundarios. Se especula que esta generación de RNAdc independiente de iniciador,

es la ruta que siguen los RNA aberrantes destinados a ser degradados, también denominada "cosupresión" por semejanza a lo que ocurre en las plantas(191). Después de que la señal se ha amplificado por una reacción en cadena de la RNAPol, se tiene una concentración suficiente de siRNAs para contrarrestar a un número cada vez mayor de RNAs blancos, que ahora puede ser atacado por diversas regiones, lo que aumenta la efectividad del sistema.

La amplificación de la RNAi entonces puede tener las siguientes explicaciones: que la enzima Dicer corte al RNAdc en varios siRNAs primarios potencialmente capaces de reconocer una molécula blanco, que haya un mecanismo catalítico en el cual se usan múltiples veces los siRNAs o que una RNAPol use los siRNAs como iniciadores sobre el RNAm blanco para generar RNAdc y subsecuentemente siRNAs secundarios (147). Mientras que para plantas y gusanos puede ser la suma de los tres casos, para mamíferos e insectos sólo la segunda opción parece ser la única operante (56, 68, 73, 132, 190). A continuación se revisan algunas condiciones que activan la respuesta de RNAi.

Infecciones virales

El genoma de la gran mayoría de los virus que se conocen en la actualidad está formado por RNA (lo cual es particularmente cierto para los virus de plantas) (2). El genoma de estos virus puede ser de RNA de cadena sencilla (más del 90% en el caso de los virus de plantas) o de doble cadena. En el caso de los virus de RNA de cadena sencilla el genoma es replicado a través de intermediarios de RNAdc, los cuales pueden activar directamente la vía interferente (1, 36, 101, 154, 158, 174). Debido a la capacidad potencial de este tipo de virus para activar la RNAi, una infección viral se puede ver entonces como una carrera entre la maquinaria de silenciamiento celular y la replicación del virus (2).

La evidencia más clara de la función de la RNAi como un sistema de defensa antiviral se deriva de estudios genéticos en plantas (11). Las plantas mutantes que son incapaces de montar una respuesta de RNAi son más susceptibles a infecciones virales; por ejemplo, mutantes de la planta *Arabidopsis thaliana* que son deficientes en la enzima RNAPol, que es uno de los componentes de la vía de RNAi, son extremadamente sensibles a la infección por cucumovirus (37,126). Otra de las

evidencias en favor del papel del RNAi como un sistema de defensa contra virus se basa en el hecho de que muchos de los virus de plantas activan eficientemente la vía de RNAi, y a la vez, algunos de ellos producen proteínas de contradefensa contra esta vía como son la proteína 2b del virus del mosaico del pepino y la proteína p25 del virus X de la papa, que son capaces de bloquear el silenciamiento, así como su dispersión en la planta y que por lo tanto juegan un papel esencial en la patogénesis viral (4, 12, 18, 23, 87, 179, 180, 182). Esto mismo se ha observado en virus de insectos, como el virus de la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), que también produce una proteína que bloquea la respuesta de RNAi en células en cultivo, proteína que es esencial para la replicación del virus en estas células (101). Esto apoya la hipótesis de que el RNAi también funciona como un sistema de defensa antiviral en células animales. Sin embargo, no se conoce la relevancia que este tipo de defensa pudiera tener en los mamíferos.

Estas observaciones sugieren que el mecanismo de RNAi podría haber servido como un sistema de defensa efectivo contra los primeros patógenos, lo que justificaría su conservación a través de la evolución, aún cuando surgieron otros mecanismos de defensa ligados al aumento en la complejidad de los organismos vivos, como es el caso de los anticuerpos y el interferón en los vertebrados. Sin duda es interesante que este mecanismo ancestral esté todavía presente en muchos organismos eucariontes hoy en día, en los cuales aparentemente continúa jugando un papel importante en el control de entidades que son percibidas como de naturaleza extraña.

Transposones

Otra función atribuida a la RNAi es la de cuidar la integridad del genoma de posibles agentes que lo puedan alterar, como pueden ser los elementos móviles conocidos como transposones, por lo que se le ha llegado a considerar como el "sistema inmune del genoma" (147). Las alteraciones causadas por los transposones pueden ser desde simplemente mutar la región donde se insertan hasta provocar traslocaciones cromosómicas. En *C. elegans* que es donde se sabe más del sistema interferente, cuando se pierde la función de un gen que forma parte de la ruta de RNAi, se activan muchos transposones en la línea germinal y el *C. elegans* se convierte en un mutador natural, indicando que la RNAi funciona para reprimir la

dispersión de transposones, en el genoma de las generaciones subsecuentes de gusanos (89). El silenciamiento de los transposones requiere algunos componentes de la maquinaria de RNAi, ejemplo Mut-7 que es una exonucleasa 3'-5' y su mutante se transpone sufre muchas transposiciones (171), por lo que Mut-7 puede participar degradando los fragmentos de mensajeros producidos por el complejo RISC que todavía son traducibles. Efectivamente, se han encontrado los productos de degradación de los transposones que se mueven por intermediarios de RNA y de DNA, por lo que esta función puede ser una realidad (39, y datos no publicados mencionados en 13 y 147). Resulta interesante saber si esta función se aplica a otros organismos, incluyendo los humanos, donde la secuencia completa del genoma ha revelado que contiene un 45% de secuencias remanentes de invasiones previas con elementos tipo transposon-virus que todavía parecen estar activos (147).

RNAs aberrantes

De un modo similar, el sistema de RNAi pudiera ser usado por la célula para sensar y destruir los RNAs con algunos errores, es decir, RNAs aberrantes cuya traducción pudiera generar proteínas con una función alterada. Los RNAs aberrantes se pueden producir por terminaciones prematuras de la transcripción, por un procesamiento inapropiado, por la falta de cola de poliA, por contener mutaciones sin sentido o por estar en niveles elevados como los que producen los transgenes (191). Para activar la RNAi el RNA aberrante de cadena sencilla tiene que ser convertido a RNAdc sin la necesidad de un RNA iniciador, por medio de una RNAPol postulada ser el sensor de los RNAs aberrantes (191).

RNAs endógenos

Nuevamente en *C. elegans* se reveló la existencia de una nueva clase de reguladores negativos de genes que codifican para proteínas, que aunque no disparan propiamente la RNAi, sí usan algunos de sus componentes y regulan la expresión genética a nivel de la traducción (63, 77, 88, 92). Estos reguladores son RNAs pequeños denominados RNAs temporales pequeños (stRNAs, por small temporal RNAs) como son *let-7* y *lin-4* (99, 155, 185), que se transcriben como precursores de 70 bases y forman una estructura de tallo y asa, procesada por la enzima Dicer para generar la forma activa que es similar a un siRNA (63, 77, 88, 92)

(Figura 7, recuadro inferior). La interferencia generada por los stRNAs no degrada los RNAs blancos, sino más bien sólo se unen a ellos en forma de un complejo protéico que incluye el duplex stRNA-RNAm con algunas bases desapareadas (65), que parece ser responsable de la represión de la traducción del RNA blanco al impedir la iniciación de la traducción, pero sin degradar al RNAm (135, 166).

Aunque hasta ahora *let-7* y *lin-4* son los únicos dos stRNAs para los cuales se ha demostrado una función reguladora, éstos forman parte de una familia creciente de RNAs endógenos que en términos más generales se conocen como microRNAs (miRNAs) (93, 96, 98, 125). Más de 150 miRNAs se han identificado en *Drosophila*, *C. elegans*, mamíferos y más recientemente en plantas. La función de los miRNAs se desconoce, pero su abundancia sugiere que cuando menos algunos de ellos desempeñan un papel regulatorio. En este sentido, *Drosophila melanogaster* se han reportado miRNAs que son parcialmente complementarios a dos secuencias (conocidas como cajas K y Brd) que están involucradas en la regulación post-transcripcional de muchos RNAs (94). Puesto que la enzima Dicer genera tanto siRNAs como stRNAs, puede decirse que representa un punto de intersección entre las rutas RNAi, degradativa mediada por los siRNAs y RNAi represora llevada a cabo por los stRNAs.

La RNAi en el gusano *C. elegans* y en las plantas

Dos aspectos adicionales del sistema RNAi que operan tanto en *C. elegans* como en plantas, son la amplificación de la señal interferente y la diseminación sistémica de la misma. Más aún en *C. elegans* esta respuesta puede perdurar en la siguiente generación, es decir, ser heredable (50, 176, 186). En contraste en células de insecto y de mamífero, la interferencia se comporta de manera autónoma-celular, sin amplificarse ni diseminarse. Las plantas llevan la RNAi a un nivel más extremo, metilando genes y promotores de genes en el núcleo que comparten identidad con el RNA que disparó la RNAi (117, 181).

Las plantas también rechazan algunos transgenes montando la respuesta interferente contra los RNAs del transgen y si estos RNAs tienen identidad con los endógenos, estos últimos también se degradan, dando origen a lo que se conoce como "cosupresión" (129). Se han propuesto a las RdRps celulares mismas como los sensores de RNAs aberrantes, ya que tales sensores deberían activarse sólo con

concentraciones elevadas de RNA blanco, como sería el caso de los transgenes que causan la cosupresión en las plantas (69). Las RNAPols como supuestos sensores de RNAs aberrantes, deben ser polimerasas con baja afinidad y modesta procesividad, lo que permitiría ignorar a los RNAs celulares "sanos" (191). De acuerdo a esta teoría, en tomates se producen siRNAs 3' preferentemente del transgen que disparó el silenciamiento y no del RNAm endógeno, sugiriendo que la RNAPol inicia la copia de RNA (independiente de iniciador) del extremo 3' del transgen abundante y aberrante y no del RNA endógeno menos abundante y no aberrante (69).

Evolución del sistema como herramienta

Dado que el fenómeno de RNAi resulta en el silenciamiento eficiente y específico de un gen dado, recientemente se ha implementado su uso en una amplia variedad de organismos para alterar la expresión de un gen de interés, y así definir su función. Este sistema ha sido aplicado con particular éxito en *C. elegans*, *Drosophila* y en las plantas. Por ejemplo, en el caso de *C. elegans*, la evaluación por RNAi de la función de genes individuales se ha extendido al análisis de casi el total de los 19,000 genes predichos para este organismo, habiéndose podido determinar la función de un gran número de genes (8, 84).

En base a la secuencia de DNA de un gen (lo cual en esta era acelerada de secuenciación de genomas completos pareciera no ser ya una limitante), se puede sintetizar un RNAdc que bloquee de manera potente y específica la expresión del gen. Esto ofrece una alternativa rápida a la laboriosa generación de organismos "knockout", los cuales requieren ser manipulados genéticamente para afectar el gen de interés.

La primer molécula interferente usada en experimentos de silenciamiento fue el RNAdc, que para *C. elegans* y plantas puede ser una molécula larga. En *C. elegans* el RNAdc se ha introducido al organismo por varios medios incluyendo la microinyección, incluso alimentando al gusano con RNAdc desnudo o con bacterias que expresan el RNAdc o hasta simplemente colocando al gusano en una solución de RNAdc (50, 170, 176). El éxito obtenido con la ingesta de RNAdc en este sistema sugiere que ésta puede ser una vía natural de "vacunación" en el nemátodo para crear escudos contra los virus y los transposones (147).

La segunda molécula interferente que se puede usar dirigir el silenciamiento genético la constituyen los siRNAs, los cuales como se mencionó anteriormente, son intermediarios verdaderos en la ruta de RNAi. De hecho los siRNAs establecieron la interconexión entre todos los mecanismos interferentes de los diversos organismos.

Era deseable aplicar esta tecnología en mamíferos, pero para su implementación había que sortear el obstáculo que representa la presencia de otras respuestas potentes hacia RNAdc propias de las células de los mamíferos. Tales respuestas denominadas “respuestas de pánico”, son las que provocan que se arrete toda la traducción celular y eventualmente la célula llega a apoptosis (57, 61). Se sabe que un RNAdc mayor de 30 pares de bases desencadena tales respuestas y apoptosis (31) 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, con la consecuente represión total de la síntesis de proteínas. En la segunda vía, el RNAdc activa indirectamente a una ribonucleasa, la RNAsa L, la cual degrada todos los RNAs celulares de manera no específica. Esta respuestas parece estar ausentes en células embrionarias donde si se tolera el RNAdc largo y se activa eficientemente la RNAi (137, 169, 184).

En células somáticas de mamífero la RNAi sólo tuvo éxito cuando se emplearon siRNAs sintetizados químicamente. Los siRNAs sintéticos evitan las respuestas inespecíficas celulares, pero son capaces de activar la interferencia porque imitan los productos primarios que genera la enzima Dicer al reconocer un RNAdc (22, 41, 43, 132).

Sin lugar a dudas ésta metodología tendrá un impacto tan revolucionario en el estudio de la función de los genes de un organismo como en su momento lo tuvieron la técnica de amplificación de ácidos nucleicos, conocida como reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y las herramientas de transgénesis utilizadas para la generación de organismos modificados genéticamente.

Actualmente, el método más usado para suprimir la expresión de un gen por RNAi en células de mamífero en cultivo consiste en introducir siRNAs sintéticos a las células con la ayuda de liposomas (15, 41-43, 71, 100, 116). Este método, sin embargo, tiene varias desventajas, incluyendo el hecho de que la eficiencia de lipofección, es decir, el número de células a las que se les puede introducir el siRNA, suele ser bajo y variable. La otra desventaja de esta metodología es que los siRNAs sintéticos tienen

un efecto transitorio de 4-6 días en el interior de la célula (73, 90). De hecho la RNAi en células de mamífero debe referirse como una técnica de “knockdown” y no como uno de “knockout”, por no nulificar la síntesis de la proteína blanco en la mayoría de los casos y principalmente por no involucrar la eliminación de la expresión de un gen por medios mutagénicos (71). Esto, aunado al hecho de que aparentemente los mamíferos carecen de mecanismos de amplificación del silenciamiento por una RNAPol (24, 56, 68, 73, 90, 132, 160, 190), ha motivado la búsqueda de alternativas para potenciar o prolongar el efecto interferente de los siRNAs, algunas de las más relevantes se describen a continuación.

Con la finalidad de mantener constitutiva la respuesta de RNAi, varios grupos de investigación se han dado a la tarea de desarrollar vectores de expresión para células de mamífero que produzcan cantidades elevadas y constantes de siRNAs. De esta manera se han logrado inhibir de manera estable la expresión de genes endógenos. La estructura de los precursores de los stRNAs sirvió de base para diseñar los llamados shRNAs (del inglés “small hairpin” RNAs) que se transcriben a partir de vectores de expresión, generando estructuras de tallo y asa que son reconocidos y procesados por la enzima Dicer, para dar lugar a siRNAs que inducen la degradación del RNAm blanco como se aprecia en la **Figura 7** (20, 115, 136, 141, 167, 189,196). Para controlar el tamaño de los shRNAs, éstos se transcriben a partir de promotores celulares específicos para la RNA polimerasa III, la cual sintetiza RNAs pequeños con sitios de inicio y terminación de la transcripción bien definidos, cuyos productos no necesariamente son modificados postranscripcionalmente (20, 136, 137, 167). Los shRNAs sí degradan al RNA blanco a diferencia de los stRNAs, y cada molécula de shRNA expresada forma un complejo RISC con alto recambio, pudiendo degradar varios RNAs blanco, amplificando la interferencia. También ha habido éxito en silenciar genes cuando se expresan intracelularmente las 2 cadenas de los siRNAs donde se hibridan para dar lugar al siRNA funcional (122), aunque tenga 4 bases sobresalientes, en lugar de las dos que produce la enzima Dicer sobre un RNAdc o un shRNA.

De esta manera se ha podido silenciar de manera potente y estable la expresión de genes en células de mamífero en cultivo, de manera similar a como se había logrado previamente en organismos invertebrados, incluyendo *C. elegans*, *Drosophila* y otros insectos, así como en eucariontes unicelulares(164).

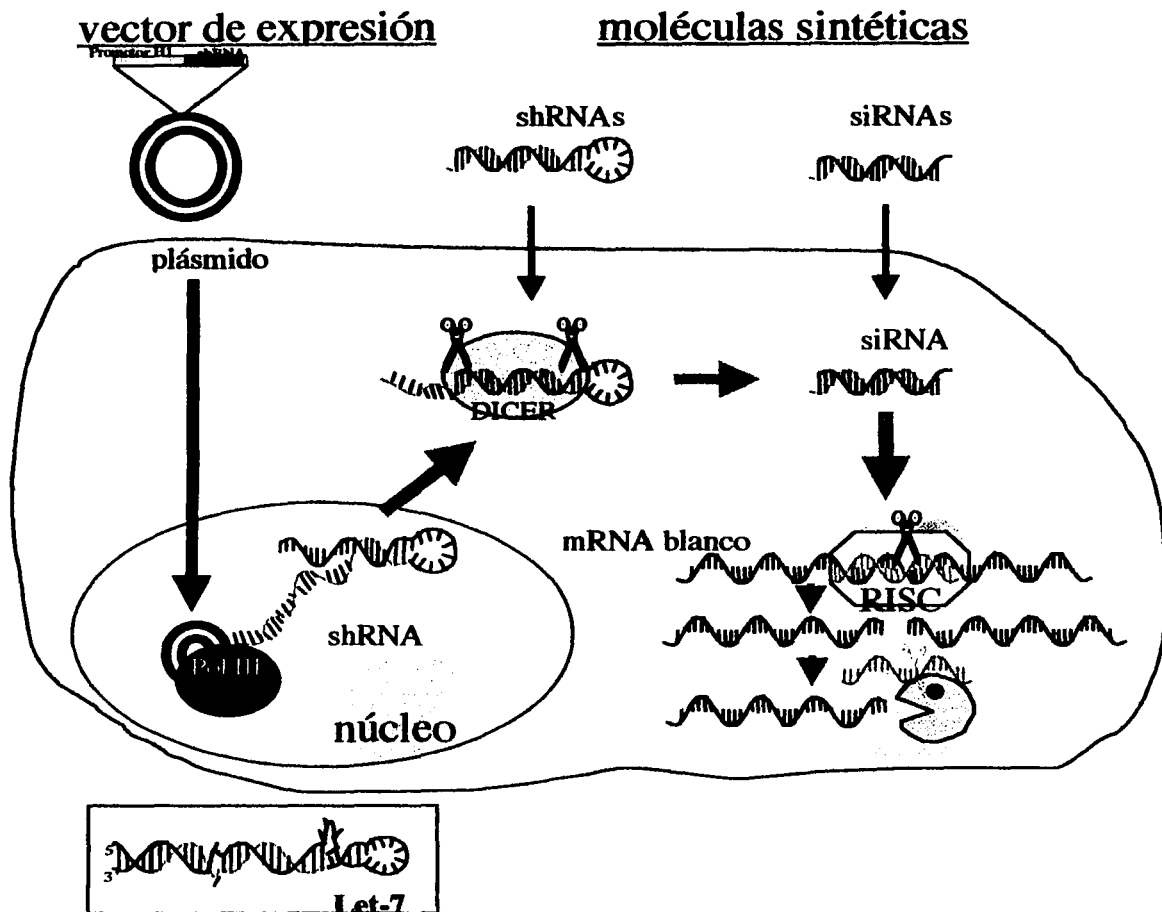


Figura 7. RNAi en células de mamífero. Los siRNAs pueden activar la RNAi en células de mamífero sin despertar respuestas celulares inespecíficas hacia RNAi. Estos siRNAs pueden ser sintéticos e introducirse a la célula por medio de una transfección, o ser generados a partir de shRNAs. Los shRNAs, a su vez, pueden también ser sintéticos, o producirse a partir de vectores de expresión en el núcleo celular; en ambos casos los shRNAs son procesados intracelularmente por la ribonucleasa Dicer. Cada siRNA se incorpora a un complejo RISC que a su vez puede reconocer un RNAm blanco tomando como guía a la cadena negativa (en rojo) del siRNA. El RNAm es cortado y degradado en su totalidad para evitar su traducción. Los shRNAs se basan en la estructura de los stRNAs (Ej. Let-7, recuadro inferior, resaltando los desapareamientos con amarillo intenso), pero a diferencia de éstos últimos, los shRNAs sí degradan a la RNAm blanco. Los shRNAs se transcriben a partir de promotores específicos de la RNA polimerasa III, para delimitar el tamaño del RNA.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Perspectivas para la RNAi

Es claro que la RNAi está evolucionando como una herramienta extremadamente poderosa para analizar la función de un gene por medio de inhibir su expresión a nivel de la traducción y observar el resultado de esta manipulación. Así, se están realizando esfuerzos para analizar el genoma completo de *C. elegans*, evaluando cuales son las consecuencias de inhibir uno a uno todos los genes de este organismo (8, 84). Enfoques similares se están llevando a cabo en otros organismos, incluyendo plantas. En un esfuerzo conducido por un grupo de laboratorios se está llevando a cabo la inhibición individual de la expresión de cada gen del genoma humano, utilizando como sistema de análisis células en cultivo y shRNAs, lo cual permitirá tamizajes genéticos de pérdida de función a gran escala, así como la evaluación rápida de las interacciones genéticas que ocurren en células de mamífero.

Dada la posibilidad de inhibir de manera eficiente la expresión de un gen a través de RNAi, se ha propuesto también que este sistema pudiese tener aplicaciones terapéuticas, a través de inhibir la producción de proteínas involucradas en el establecimiento o progresión de una enfermedad, como podrían ser las proteínas responsables de la interacción huésped-parásito, o involucradas en la replicación del patógeno, en oncogénesis o en toxicidad celular. El efecto antiviral específico de este sistema ya ha sido demostrado en células en cultivo para el virus sincitial respiratorio, el virus de la inmunodeficiencia humana, poliovirus, el virus del Dengue y el virus de la hepatitis C (1, 15, 32, 59, 74, 79, 85, 97, 131, 153). Estos primeros resultados antivirales de la RNAi sugieren que la inhibición de la expresión genética por siRNAs será un enfoque terapéutico novedoso para enfermedades infecciosas, una vez que puedan desarrollarse métodos eficientes para administrar los siRNAs a organismos completos.

Mientras ésto se logra, el tratamiento *ex vivo* con vectores que expresen establemente siRNAs pudiese ser aplicado para combatir enfermedades virales crónicas tan importantes como el SIDA. En este caso se pudieran extraer células de la médula ósea de una persona infectada y tratarlas con siRNAs dirigidos contra el genoma viral o contra un receptor necesario para la infección (por ejemplo CCR5), para después ser reimplantadas y dar origen a células resistentes a la infección por el VIH (70).

La expresión de shRNAs a partir de vectores virales que se están evaluando actualmente para la administración de genes en protocolos de terapia génica, como son los adenovirus, los virus adeno-asociados o los retrovirus (19, 38, 138), entre otros, ofrece una avenida importante para silenciar genes específicos *in vivo*.

Aunque la utilización del RNAi para tratar enfermedades que se caracterizan por la expresión inadecuada de proteínas mutantes o silvestres, como en algunos tipos de cáncer (16), queda todavía por demostrarse, no hay duda de que esta tecnología ofrece, cuando menos en principio, revolucionar la forma como se lleva a cabo la investigación en la era post-genómica.

OBJETIVO

Implementar un sistema metodológico que permita inhibir eficientemente la expresión de genes específicos de rotavirus

Al inicio de este proyecto, se probaron varios tipos de enfoques para inhibir la expresión de genes de rotavirus: oligodesoxinucleótidos con enlaces fosforotioéster (ODNs), ácidos peptidonucleicos (PNAs), ribozimas, RNAs antisentido y versiones truncadas de proteínas virales para que actuaran como proteínas "dominantes negativas", los tres últimos expresados por vectores basados en el virus Sindbis. Todas estas técnicas de inhibición de la expresión génica tuvieron un éxito muy limitado en el sistema de rotavirus, por lo cual se abandonaron.

Teniendo presente el objetivo inicial, se decidió probar la interferencia por RNA, basada en siRNAs, como una nueva alternativa para investigar la función de los genes de rotavirus, usando como modelo de inhibición el gen de la proteína VP4 del virus.

HIPOTESIS

El empleo de la RNAi, basada en siRNAs, inhibirá la síntesis de la proteína VP4 lo suficiente para observar y caracterizar un fenotipo en la progenie viral

MATERIAL Y METODOS:

Células y virus:

La línea celular empleada fue MA104, linaje derivado de células epiteliales de riñón del mono *Rhesus*. Las células se crecieron en medio mínimo esencial de Eagle (MEM), suplementado con 10% de suero fetal bovino. En cada uno de los ensayos se usaron células MA104 de reciente confluencia, para tener una monocapa y resultados más reproducibles. La cepa de rotavirus del mono *Rhesus* RRV, fue suministrada por H.B. Greenberg, Universidad de Stanford, Palo Alto CA. La cepa de rotavirus porcina YM fue aislada en el laboratorio y la cepa bovina de rotavirus RF fue proporcionada por J. Cohen, INRA, Francia.

siRNAs:

El siRNA^{VP4} (Figura 8), se diseñó de acuerdo a las recomendaciones de la compañía Dharmacon Research Inc (Lafayette, Co., EUA) y del grupo de Thomas Tuschl (41, 42), las cuales básicamente son:

1. Los siRNAs son RNAs duplex de 21 bases en los que sólo 19 bases están pareadas y dos bases sobresalen en cada extremo 3'. Las bases salientes son dos dTs (deoxitimidinas), que se sabe aumentan la estabilidad a la degradación por RNasas en el cultivo celular.
2. La región blanco de preferencia debe estar de 75 a 100 nucleótidos hacia el extremo 3' del codón de inicio, para evitar la región rica en complejos de inicio de la traducción alrededor del AUG.
3. Se buscan dos As, que pueden ser seguidas de 19 bases cualquiera. De ésta manera las 21 bases de la hebra antisentido son complementarias al RNA blanco.
4. Que el porcentaje de G/C sea mayor de 30 y menor de 70%.
5. Asegurarse mediante una búsqueda en BLAST (NCBI) que la secuencia sólo reconozca el gen usado como blanco.
6. Buscar las siguientes AAs en el RNA blanco si no se cumplen los criterios en los puntos 4 y 5, para el primer par de As encontrado.

>75bases

AUG AANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN.....

5' -**UCUAGGUCCUUUUGC**UCAATT-3' Sentido
 IIIIIIIIIIIIIIIIIIIII
 3' -TTAGAUCCAGGAAAACGAGUU-5' Antisentido

Figura 8. Diseño del siRNAVP4. Se denota en negritas, la posición de las As y las 19 bases siguientes que constituyen la hebra positiva del siRNA. Las Ts sobresalientes del extremo 3' de la hebra antisentido del siRNA, son deoxinucleótidos de timidina y complementarios al RNAm blanco.

La estructura secundaria del RNA blanco no parece importar para que funcione un RNA interferente, pero sí la secuencia del siRNA, ya que una sola base diferente en el blanco abate el efecto interferente. No hay garantía de que cualquier siRNA funcione, por lo que se recomienda sintetizar al menos cuatro de ellos, por gen.

La síntesis de los siRNAs se ordenó a la compañía Dharmacon Research Inc (Lafayette, Co., EUA) a la escala de 0.2 μ M, purificados y apareados (duplex), listos para la transfección. Se reciben liofilizados en amortiguador de hibridación y se reconstituyeron con agua libre de RNAsas. La concentración final de la solución de siRNAs es en mM: 100 acetato de potasio, 30 HEPES-KOH pH 7.4, 2 acetato de magnesio.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Lipofección de los siRNAs

Para contar con una eficiencia de transfección \geq a 75% que además fuera reproducible, se requirió de usar monocapas completas (sin huecos) de células MA104 que hubieran alcanzado la confluencia el mismo día de la transfección con los siRNAs. Esto también fue útil cuando las células lipofectadas se dejaron 72 h en MEM sin suero, así las células no estaban senescentes al momento de ser infectadas con los rotavirus. El uso de monocapas completas, también impidió que la mezcla de lipofección fuera más agresiva e hiciera despegarse a las células del plástico, como sucede cuando están subconfluentes, lo que repercutiría en la reproducibilidad del ensayo.

Los siRNAs se emplearon como una mezcla maestra con el lípido oligofectamina (Invitrogen, Life technologies), de acuerdo al grupo del Dr. Tuschl (41,42).

Preparación de la mezcla maestra de lipofección:

1. En un tubo de poliestireno se colocaron 3 μ l de oligofectamina y 12 μ l de MEM sin suero (s/s), mezclando por pipeteo 10 veces, suavemente. La mezcla se dejó incubando 5-10 minutos.
2. En un tubo de polipropileno se mezclaron en vortex, 3 μ l del siRNA a la concentración de 20 μ M (0.84 μ g, 60 pmoles) con 50 μ l de MEMs/s.
3. Los siRNAs del paso 2 se mezclaron con la oligofectamina del paso 1, empleando una micropipeta para mezclar lentamente. La mezcla se incubó 20 minutos a temperatura ambiente.
4. Después de la incubación se añadieron 32 μ l de MEM s/s mezclando nuevamente con la micropipeta. De esta mezcla, se escalaron los volúmenes según el formato de cultivo para usar: 200 μ l para el formato de placa de cultivo C-24, 300 μ l para un pozo C-12, 350 μ l si el pozo contenía un cubreobjeto, 600 μ l para un pozo C-6 y 2 ml para un frasco F75.
5. La mezcla se dejó actuar sobre las células MA104 previamente lavadas dos veces con MEMs/s, entre 2 y 3 h, al cabo de las cuales se lavaron una vez con MEMs/s (parece ser suficiente retirar la mezcla y agregar medio sin suero). A partir de las 12-24 h se sustituyó el medio por MEMs/s, con antibiótico, hasta el momento de ser infectadas con los rotavirus, según se especifica.

Inmunofluorescencia

Para este tipo de análisis, las células MA104 se crecieron sobre cubreobjetos en cajas C-12, para que hubiera una monocapa reciente de células el día de la transfección con los siRNAs. A las 72 h postlipofección (p.l.f.) con los siRNAs, las células se infectaron con el respectivo rotavirus a una multiplicidad de infección (moi) de 0.5 ó 1.0 ó simplemente se procedió directamente a la inmunofluorescencia cuando se trató del siRNA^{LamA/C} que se usó para probar el sistema interferente en las células MA104 y como control de la eficiencia de lipofección.

Al cabo de 8 horas postinfección (p.i.) se procedió a la inmunofluorescencia como sigue:

1. La monocapa celular se lavó una vez con PBS y se fijó durante 20 min con 350-500 μ l de una solución filtrada al 2% de p-formaldehído (SIGMA CHEMICALS) en PBS. Al finalizar la incubación se hicieron 4 lavados de 5 minutos cada uno con 1ml de PBS1X-5mM NH_4Cl .
2. Las células MA104 fijadas se permeabilizaron durante 15 min con 60 μ l del amortiguador de permeabilización (PBS 1X, 1% BSA, 0.5% de tritón X100).
3. Las células se incubaron con el o los primeros anticuerpos por una hora a temperatura ambiente en 50 μ l de amortiguador de permeabilización. Para detectar las proteínas LamA/C como estandarización del método en la línea celular MA104, el primer anticuerpo fue el monoclonal LamA/C, Mab636 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Para probar el efecto del siRNA^{VP4} sobre los niveles de la proteína VP4 en células infectadas con rotavirus, los primeros anticuerpos que se usaron fueron: el suero policlonal de conejo (C-6) en dilución 1:250 para detectar la proteína NSP5 como control interno de infección, el cual fue generado en el laboratorio, así como el anticuerpo monoclonal HS2 (donado por H.B. Greenberg), en dilución 1:100 para detectar a la proteína VP4. Al finalizar la incubación se hicieron 4 lavados de 5 minutos cada uno con 1ml de PBS1X-5mM NH_4Cl .

4. Las preparaciones se incubaron en 50 μ l de amortiguador de permeabilización con los segundos anticuerpos por una hora a temperatura ambiente y en oscuridad. En el caso de LamA/C sólo se usó anti-ratón Alexa 488, y para detectar las proteínas NSP5 el anti-conejo Alexa 568 y para VP4 el anti-ratón Alexa 488 (Molecular Probes) para detectarlas en rojo y verde, respectivamente. Al finalizar la incubación se hicieron 4 lavados de 5 minutos cada uno con 1ml de PBS1X-5mM NH_4Cl
5. El cubreobjetos con las células hacia abajo se montó sobre un portaobjetos con 3 μ l de citifluor (TED PELLA Inc) fijando sus bordes con barniz de uñas.
6. Las preparaciones se visualizaron en un microscopio confocal MRC-600 (Bio-Rad) con ayuda de el programa CoMOS MPL-1000. Para observar las dobles tinciones en la misma muestra se utilizaron las líneas de excitación amarilla (λ 568 nm) o azul (λ 488 nm) y los filtros de emisión correspondientes K1 o K2. Del mismo aparato se tomaron las impresiones fotográficas.
7. La eficiencia de transfección se obtuvo por el cociente entre las células con efecto interferente sobre LamA/C (membrana nuclear con fluorescencia débil) sobre el total de las células control, multiplicado por 100. También por el cociente entre las células VP4 positivas sobre el total de células infectadas (NSP5 positivas), multiplicado por 100. Se pudieron contar \approx 430 células de extremo a extremo de un cubreobjetos de 18 mm de diámetro.

Inmunodetección tipo Western blot

Para este tipo de análisis se procedió como se expone a continuación:

1. Se infectaron monocapas de MA104 a diferentes tiempos: 3, 6, 9 y 12 h, que previamente habían sido lipofectadas con siRNAs 72h antes.
2. Al cabo de cada tiempo las células se lavaron una vez con PBS y se lisaron con amortiguador de carga 1X (50mM Tris-Cl pH 6.8, 2% SDS, 0.1% azul de bromofenol, 10% glicerol, 1% β -mercaptoetanol) previamente calentado a 100°C para mejorar la lisis. Del amortiguador de lisis se usaron 100 μ l para el formato C-12, 50 μ l para pozos C-24 y 25 μ l para pozos C-48.
3. Los lisados se hirvieron durante 5 minutos después de ser colectados.
4. Se tomaron 5 μ l de lisado para electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida 11 %.
5. Las proteínas se transfirieron a una membrana inmobilon-NC (Millipore), durante 1 h a 50 V, en amortiguador 1X CAPS (10 mM) empleando el módulo de transferencia Mini Trans-Blot, dentro del sistema MiniPROTEAN 3.
6. La membrana se bloqueó con 5% de leche descremada (Carnation) en PBS 1X-0.1% tween 20, durante 1h en agitación.
7. La membrana se incubó con los primeros anticuerpos diluidos en PBS-0.1% tween 20: el monoclonal HS2 para detectar VP4, y para detectar VP2, el monoclonal 3A8. Los sueros policlonales de conejo C-91 para reconocer NSP2 y C-75 anti-RRV para reconocer todas las proteínas estructurales. Los anticuerpos monoclonales se usaron a una dilución 1:1000 y los policlonales a dilución de 1:2000. Al finalizar la incubación se hicieron 4 lavados de 10 minutos con PBS-0.1% tween 20.
8. Los segundos anticuerpos que se usaron, fueron anti-conejo conjugado a peroxidasa (NEN) y anti-ratón conjugado a peroxidasa (Zymed), usados en dilución de 1:2000 y 1:3000, respectivamente en PBS-0.1% tween 20. Al finalizar se hicieron 4 lavados de 10 minutos con PBS-0.1% tween 20.
9. La detección indirecta de las proteínas se realizó con el sustrato para peroxidasa Western Ligthning, según las instrucciones del proveedor (Perkin-Elmer) exponiendo una película hipersensible X-Omat (Kodak) a diferentes tiempos para no saturar las señales. La mejor película se sometió a análisis densitométrico con el programa Visiophor1-D, y los valores de las bandas fueron tomados como datos crudos (píxeles).

Determinación del rendimiento viral

Para estimar el efecto global sobre la progenie viral debido a la presencia de los siRNA^{VP4}, se produjeron lisados a partir de monocapas de MA104 previamente lipofectadas con los siRNAs por 72 h como se describió anteriormente. Estas células siempre se infectaron a una moi de 0.5 para disminuir la proporción de células infectadas con más de una partícula viral y el sistema interferente no pudiera interrumpir la transcripción. Las células se cosecharon por congelación a las 12 h, lo que corresponde aproximadamente a un ciclo de replicación de rotavirus y esto constituyó el lisado que se procedió a titular de la siguiente manera:

1. Los lisados se congelaron una vez más a -70°C y después de descongelarlos, se activaron con tripsina a $20\ \mu\text{g}/\text{ml}$.
2. Se hicieron diluciones seriadas de cada lisado y se infectan monocapas de MA104 en placas de 96 pozos por 1 h a 37°C . Los pozos se lavaron 2 veces con $100\ \mu\text{l}$ de MEMs/s y se dejaron 14 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 $100\ \mu\text{l}$ de acetona 80%-20% PBS durante 30 minutos. Se lavaron con $200\ \mu\text{l}$ de PBS.
4. Las células fijadas se incubaron con el suero policlonal anti-YM (C-75) generado en el laboratorio a la dilución de 1:750 en PBS por una hora a 37°C .
5. Después de lavar una vez con $100\ \mu\text{l}$ de PBS, se dejaron incubando 1 h con proteína A-peroxidasa (Amersham-Pharmacia Biotech) a dilución de 1:2500 en PBS.
6. Para revelar las células infectadas se usó 3-amino-9-etil-carbazole (SIGMA CHEMICALS) como el sustrato para la peroxidasa, que produce un precipitado en color café.
7. La determinación del título viral se llevó a cabo contando las células teñidas (focos) en cada dilución por medio de la unidad Visiolab 1000 station (Biocom) como describió Guerrero, *et al* 2000 (64).

La fórmula para determinar el título viral a partir de focos contados con el objetivo 10X contando 9 campos fue:

de focos X dilución X 12.5 X 20 (factor de volumen de 50ul) = uff (unidades formadoras de foco)/ml

de focos X dilución X 4.5 X 20 (factor de volumen de 50ul) = uff/ml, si se contaron 25 campos.

Marcaje radiactivo, aislamiento y análisis de las partículas virales

El proceso completo se describe a continuación:

1. Se lipofectaron frascos de cultivo F75 con células MA104 a total confluencia con 2 ml de la mezcla maestra del respectivo siRNA (siRNA^{VP4} o siRNA^{LamA/C} como control), durante 2h.
2. Las células MA104 se infectaron 72 h p.i.f. de los siRNAs, 1 h con un lisado del rotavirus RRV a una moi de 1 en un volumen final de 2 ml. Las células se lavaron 2 veces con 5 ml MEM s/s y se dejaron incubando con otros 5 ml de MEM.
3. Se permitió proseguir la infección por 2.5 h y entonces el medio de cultivo se sustituyó con MEM sin metionina por 30 min. A partir de las 3 h p.i., el marcaje metabólico se llevó a cabo con 50 µCi/ml de metionina (³⁵S) (Dupont NEN) en 5 ml de medio libre de metionina, hasta llegar al efecto citopático total (24-26h p.i.).
4. El cultivo se congeló y descongeló dos veces a -70°C para generar el lisado.
5. El lisado fue ultracentrifugado a 108158 g durante 1 h.
6. La pastilla generada se resuspendió en 750 µl de buffer TSMC, en mM; 20 Tris, 1 M gCl₂.6H₂O, 150 NaCl, 100 CaCl₂, pH 8.2), mezclándola con un vortex con 750 µl de Freón (cloro, difluoro metano). La mezcla se centrifugó a 2940 g durante 5 minutos, recuperándose la fase acuosa (virus). Se adicionaron otros 750 µl de TSMC a la fase orgánica y se repitió la extracción tres veces más.
7. El volumen total extraído se sometió a una centrifugación isopícnica en [0.65 mM CsCl], llevando a 5 ml con TSMC en un tubo con 2.2 g de CsCl. Para formar el

gradiente la mezcla se centrifugó durante 18 h a 155748 g, como describió Espejo RT, *et al* 1981 (44).

8. Las bandas opalescentes se visualizaron bajo la luz blanca de una lámpara manual, tomándose fotografías con una cámara digital.
9. Las partículas en el gradiente se recolectaron de dos maneras: mediante fracciones de 3 a 5 gotas con una bomba peristáltica o mediante punción de cada una de las bandas con ayuda de una jeringa de 3 ml.
10. Alicuotas de cada fracción o banda se desalaron con la resina sephadex G-25 coarse (Sigma chemicals) estéril lavadas con PBS y se empacaron en una punta de micropipeta de 200 μ l. La resina se secó y se le pasaron 20 μ l de TSMC, 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.
11. Para analizar el perfil protéico de las bandas o fracciones, 5 μ l de cada muestra desalada se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida 11%-SDS como se describió anteriormente, incluyendo un marcador de peso molecular marcado con carbono 14 (14 C).
12. Terminada la electroforesis el gel se fijó 30 minutos (50% metanol, 10% ácido acético) y se lavó 3 veces por 10 minutos con agua destilada, se trató 15 minutos con una solución de ácido salicílico al 2% y se secó bajo calor-vacío en un sistema SAVANT.
13. Para revelar el contenido protéico, el gel seco se usó para exponer una película hipersensible (X-Omat de Kodak) a -70°C y se reveló la película. El proceso se repitió hasta ajustar las cantidades de muestra y los tiempos de exposición en los que las señales de proteínas fueran equivalentes y no saturadas, para que el análisis densitométrico posterior pudiera ser cuantitativo.
14. Para determinar el título de las partículas infecciosas en cada banda o fracción, un alícuota desalada se activó con tripsina como si fuera un lisado celular y se prosiguió como se describió anteriormente.
15. El título relativo en cada banda o fracción se ajustó de acuerdo a las intensidades (concentración relativa) de las proteínas en el ensayo de electroforesis anterior.

16. La morfología de las partículas en cada banda se determinó por medio de tinción negativa de una muestra desalada. Brevemente: 10 μ l de la muestra desalada se aplicaron sobre una rejilla de cobre recubierta de formvar-carbón por 5 minutos. Se retiró el líquido con un papel filtro y se lavó con agua ultrapura por 1 min. A la rejilla se le agregaron 20 μ l de acetato de uranilo durante 1 min, se le retiró y se dejó secar. Las rejillas se visualizaron con un microscopio electrónico de transmisión CarlZeiss EM-900 a 80KV y a un aumento de 85000X.

Microscopía electrónica de las células MA104

Células MA104 completas tratadas en presencia de siRNAs e infectadas con rotavirus, se procesaron como se describe a continuación:

1. Una monocapa de MA104 a recién confluencia en Pozos C-6, se lipofectó con 600 μ l de la mezcla maestra del respectivo siRNA (siRNA^{VP4} o siRNA^{LamA/C} como control) durante 2 h a 37°C. Las células MA104 a tratar con tapsigargina no se lipofectaron con ningún siRNA.
2. Las células MA104 a 72h p.i.f. con los siRNAs se infectaron con RRV a una moi de 0.5 durante 1 h, se lavaron 2 veces con MEMs/s y se dejaron incubar con 3 ml de MEMs/s por 8 h. El tratamiento con tapsigargina 1 μ M se llevó a cabo desde 1 h hasta 8 h p.i., reemplazando el medio de cultivo por otro que contenía la droga.
3. Las células se desprendieron del pozo retirando el medio y sustituyéndolo con 2 ml de EDTA (5mM en PBS), incubando a 37°C hasta que las células se desprendieron. Las células se pasaron a tubos de 15 ml ajustando el volumen a 10 ml con PBS estéril, se centrifugaron a 3000 rpm durante 1 min desechando el sobrenadante.
4. La pastilla celular se fijó con 1.5 ml de solución 2.5% de glutaraldehído en 0.1M de cacodilato de sodio pH 7.4, durante 8 h a 4°C.
5. Después se hicieron 2 lavados de 10 minutos cada uno, con el amortiguador de cacodilato de sodio pH 7.4 a 4°C.
6. Se posfijaron con tetraóxido de osmio al 2% durante 2 h a 4°C.
7. La pastilla celular se lavó 2 veces, 10 minutos cada una, con el amortiguador de cacodilato de sodio pH 7.4 a 4°C.

8. Posteriormente se procedió a deshidratar en soluciones ascendentes de etanol, 10 minutos a 4°C cada una: 30, 50, 70, 96, 100% y un cambio de etanol 100% a temperatura ambiente.
El proceso de preinclusión se realizó a 4°C y de forma gradual con resina LR-White-etanol 1:1 durante 1h, después 1 h en LR-White-etanol 2:1, posteriormente 1 h con resina pura y finalmente toda la noche con resina total.
9. Se procedió a polimerizar a 55°C durante 24h.
10. Se obtuvieron cortes ultrafinos de 60 a 90 nm con un ultramicrotomo LEICA.
11. Los cortes se recogieron en rejillas de cobre de 200-300 mesh y se contrastaron por flotación en acetato de uranilo 2% durante 20 minutos, haciendo lavados con agua y después en citrato de plomo al 4% por 20 minutos, las rejillas se lavaron nuevamente con agua y se dejaron secar.
12. Las muestras se visualizaron por microscopía electrónica como se mencionó anteriormente.

Procesamiento de imágenes

Las películas de los ensayos de Western blot y de electroforesis de partículas virales aisladas en gradientes de CsCl, se capturaron con el programa visiolab (Francia), en formato Tiff. Posteriormente se modificaron con el programa AdobePhotoshop 3.0 (Adobe Systems Inc.).

Tanto las imágenes capturadas en el microscopio confocal con el programa CoMOS MLP-1000, como las capturadas con la cámara digital, se procesaron digitalmente a formato Tiff y se modificaron en tamaño con el programa AdobePhotoshop.

Todos los negativos del microscopio electrónico se transfirieron a papel fotográfico y las imágenes se capturaron con un scanner (Perfection 2450 photo, EPSON) bajo el formato JPEG. Posteriormente se dimensionaron con el programa AdobePhotoshop 3.0.

Northern blot

El ensayo se realizó basándose en la técnica descrita por Burnett (21) como se indica a continuación:

1. Se extrajo el RNA total con trizol™ (Invitrogen-Life technologies) según las recomendaciones del proveedor, a partir de células MA104 infectadas por 12 h con una moi de RRV. Las células habían sido previamente lipofectadas con el siRNA^{VP4} durante 24 ó 72 antes de ser infectadas. El formato fue en pozos de placas C-6 y el volumen de trizol fue de 300 µl.
2. El RNA se cuantificó en espectrofotómetro.
3. Tres µg de RNA de cada muestra se trataron con 10 µl de una solución glioxal-EtBr (se prepara mezclando 6 µl DMSO, 2 ml glioxal desionizado, 1.2 ml de amortiguador BTPE, 600 µl de glicerol 80% y 0.2ml EtBr 10 mg/ml) a 50-55°C durante 1h.
4. Se cargó la mezcla en los pozos de un gel de agarosa 1.5%, incluyendo un control de peso molecular de RNA (Cat. 15620-016, Invitrogen) y un carril con colorantes indicadores (xilen cianol y azul de bromofenol) para monitorear la electroforesis.
5. Las muestras de RNA se sometieron a electroforesis sin recircular el amortiguador de BTPE 1X (10X= 3g PIPES, 6 g Bis-Tris, 2 ml EDTA 0.5M a 90 ml agua, tratado con DEPC), aproximadamente 2 h.
6. El gel se visualizó bajo luz UV, tomándose una fotografía, para verificar por tamaño los RNAs y que las concentraciones fueran homogéneas.
7. El gel se sometió a una transferencia de 2 h a una membrana de nylon (Schleicher-Schuell, Nitran supercharge) mediante un TurboBlotter (Schleicher-Schuell), que permite la transferencia hacia abajo ("downward"), empleando un amortiguador alcalino que consta de 3 M NaCl y 0.4 M NaOH.
8. El gel nuevamente se visualizó por luz UV para verificar el éxito de la transferencia y la membrana se neutralizó con una solución de 0.2 M fosfato de sodio.
9. El RNA se fijó a la membrana con luz UV por medio de un spectrolinker (Electronics Corporation) a 100 µJ/cm² durante 80 segundos a 254 nm y se almacenó a 4°C hasta su hibridación.

10. Se prepararon dos sondas de DNA a partir de dos productos de amplificación por RT-PCR de los segmentos 4 y 6 de rotavirus RRV que codifican para VP4 y VP6 respectivamente. El marcaje se llevó a cabo con el estuche Prime-it (Stratagene Cat. 300385) usando 10 μ l de dCTP-³²P (Amersham Pharmacia Biotech) para cada sonda.
11. La hibridación se hizo en un horno de hibridación (minioven, Hybaid) a 65°C durante 2.5 h, usando 8 ml del amortiguador de hibridación (Hybuffer, Pharmacia Biotech). Las sondas se desnaturalizaron hirviéndolas 5 min antes de agregarlas.
12. La membrana se lavó 3 veces por 10 min cada una a 65°C en buffer SSC 2X (10X=1,5M NaCl, 0.15M citrato de sodio pH 7.2) con agitación continua.
13. La membrana todavía húmeda se cubrió con plástico para permitir su reutilización posterior con otras sondas y se empleó para exponer una película hipersensible en un caset de exposición a -70°C, a diferentes tiempos.
14. Las intensidades relativas se cuantificaron por densitometría como se hizo con los inmunoblots.

RESULTADOS PUBLICADOS

Artículo (6 páginas siguientes)

Rotavirus gene silencing by small interfering RNAs

Miguel Angel Déctor, Pedro Romero, Susana López & Carlos F. Arias*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Cuernavaca, Morelos 62210, Mexico

Received August 16, 2002; revised September 16, 2002; accepted September 20, 2002

RNA interference is an evolutionarily conserved double-stranded RNA-triggered mechanism for suppressing gene expression. Rotaviruses, the leading cause of severe diarrhea in young children, are formed by three concentric layers of protein, from which the spike protein VP4 projects. Here, we show that a small interfering RNA corresponding to the VP4 gene efficiently inhibits the synthesis of this protein in virus-infected cells. A large proportion of infected cells had no detectable VP4 and the yield of viral progeny was reduced. Most of the virus particles purified from these cells were triple-layered, but lacked VP4, and were poorly infectious. We also show that VP4 might not be required for the last step of virus morphogenesis. The VP4 gene silencing was specific, since the synthesis of VP4 from rotavirus strains that differ in the target sequence was not affected. These findings offer the possibility of carrying out reverse genetics in rotaviruses.

INTRODUCTION

Rotaviruses, the leading cause of severe dehydrating diarrhea in infants and young children worldwide, are non-enveloped viruses formed by three concentric layers of protein that enclose a double-stranded RNA (dsRNA) genome. The innermost layer is formed by protein VP2, which surrounds the viral genome, and small amounts of VP1 and VP3. VP6 constitutes the intermediate layer, and the outermost layer is composed by glycoprotein VP7, which forms the smooth surface of the virus. From this surface, spike-like structures formed by VP4 project (Estes, 1996). VP4 has essential functions in the virus life-cycle, including the attachment of the virus particles to cell receptors and the penetration of the virions into the cell (Estes, 1996).

In infected cells, large cytoplasmic inclusions termed viroplasm are formed, and these are thought to be the sites where double-layered particles (DLPs) assemble. The DLPs then

mature by budding from the viroplasm structures into the adjacent endoplasmic reticulum (ER). During this process, which is mediated by the interaction of DLPs with the ER transmembrane rotavirus protein NSP4, the particles acquire a transient membrane envelope (Estes, 1996). This lipid envelope, which contains VP4 and VP7 (Poruchynsky and Atkinson, 1991), is later removed by a largely unknown mechanism, to yield the mature triple-layered particles (TLPs). In addition to the role VP4 may play in the budding process, it has been suggested that this protein may be important for the removal of the lipid membrane from the intermediate enveloped particles (Estes, 1996).

In recent years, an evolutionarily conserved phenomenon called RNA interference (RNAi), which responds to dsRNA by sequence-specific silencing of the homologous genes, has been described. This phenomenon has been observed in invertebrates and plants (Sharp, 2001; Zamore, 2001; Hannon, 2002); however, the demonstration of a RNAi-like response in somatic mammalian cells had been hampered by dsRNA-triggered mechanisms, which non-specifically inhibit gene expression in vertebrates. The recent demonstration that dsRNA fragments of <30 nucleotides, known as small interfering RNAs (siRNAs), do not activate these mechanisms (Caplen *et al.*, 2001; Elbashir *et al.*, 2001) offers a great opportunity to use this pathway of gene silencing to study the function of mammalian genes. Here, we show that a siRNA corresponding to the rotavirus VP4 gene sequence efficiently and specifically inhibits the synthesis of the VP4 protein in monkey kidney cells, impairing the production of viral progeny. Most rotavirus particles purified from cells transfected with the VP4 siRNA were triple-layered, but lacked VP4, and were poorly infectious. We also show that the absence of VP4 does not prevent the intermediate membrane-enveloped viruses to lose the lipid bilayer.

*Corresponding author. Tel: +52 777 311 4701; Fax: +52 777 317 2388; E-mail: arias@ibt.unam.mx

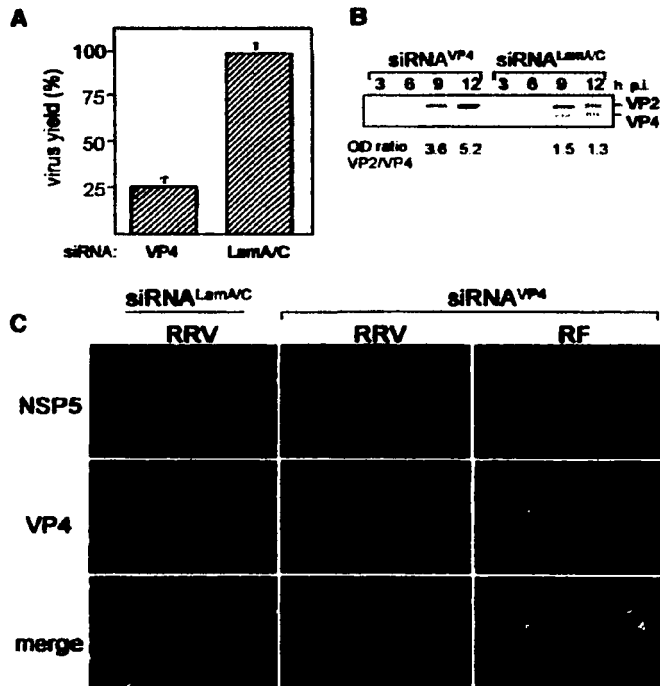


Fig. 1. Rotavirus gene silencing. (A) Rotavirus RRV viral progeny produced in cells transfected with siRNAs to VP4 and lamin A/C, expressed as a percentage of the virus yield obtained in mock-transfected cells. The viral progeny titer in mock-transfected cells was 2.1×10^6 ffu/ml. (B) Immunoblot analysis of VP4 synthesized in cells transfected with the indicated siRNA as compared with the synthesis of viral protein VP2, at various times p.i. (C) Immunofluorescence detection of VP4 and the non-structural protein NSP5 in rotavirus RRV- or RF-infected cells in the presence of siRNA^{VP4} or the unrelated siRNA^{LamA/C}.

RESULTS

siRNA^{VP4} inhibits the production of rotaviral progeny

To determine whether RNAi is functional in monkey kidney cells and its potential effect on rotavirus replication, MA104 cells were lipofected with siRNAs corresponding to gene sequences of either rhesus rotavirus RRV VP4 (siRNA^{VP4}) or protein lamin A/C (siRNA^{LamA/C}), which was used as an unrelated control. Twenty-four hours after transfection the cells were infected with RRV, and the virus progeny was harvested 12 h post-infection (p.i.) and its titer determined. The virus produced in cells infected in the presence of siRNA^{VP4} was ~25% that of mock-transfected cells, and the viral titer obtained in cells lipofected with siRNA^{LamA/C} was not affected (Figure 1A). The titer of viral progeny was reduced in siRNA^{VP4}-transfected cells to a level matching the transfection efficiency of the siRNA (see below).

The synthesis of rotavirus VP4 is affected by siRNAs

Cells lipofected with siRNAs were infected with rotavirus RRV for various times, and the accumulated VP4 protein was

detected by immunoblot using a VP4-specific monoclonal antibody (mAb). Viral protein VP2 was used as an internal control. Densitometric analysis of these proteins showed that at 12 h p.i. the VP2/VP4 ratio in cells transfected with siRNA^{LamA/C} or siRNA^{VP4} was 1.3 and 5.2, respectively, indicating that the amount of VP4 that accumulates in the presence of siRNA^{VP4} is about four times less that of cells treated with the unrelated siRNA (Figure 1B).

To characterize the synthesis of VP4 in individual cells, cell monolayers were lipofected with either VP4 or Lam A/C siRNAs and then infected with rotavirus RRV. Eight hours p.i. the cells were immunostained with a mAb to VP4 and a rabbit polyclonal antibody to NSP5, a non-structural viral protein used as an internal control. In the cells transfected with siRNA^{LamA/C} that became infected, both VP4 and NSP5 were readily detected (Figure 1C). In contrast, when the cells were lipofected with siRNA^{VP4}, only a few of the cells stained with the anti-NSP5 antibody were also stained with the VP4 mAb (Figure 1C), indicating that in those cells transfected with the siRNA^{VP4} the expression of VP4 was reduced to undetectable levels. The VP4-negative cells also expressed regular amounts of two other viral proteins tested, NSP2 and VP7 (data not shown). The fact that some of the cells

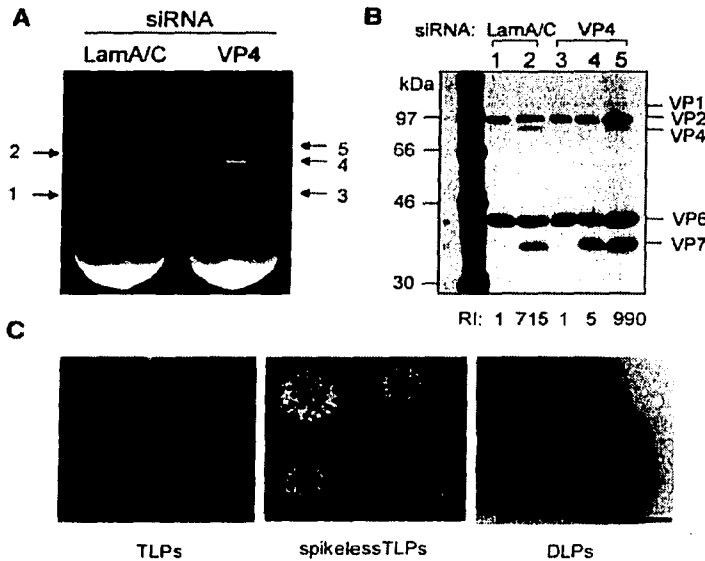


Fig. 2. Virus particles synthesized in the presence of siRNA^{VP4}. (A) Isopycnic CsCl gradients of viral particles assembled in the presence of either siRNA^{VP4} or siRNA^{LamA/C}. (B) Gel electrophoresis analysis of the viral particles present in the bands detected in the isopycnic gradients shown in (A). The lane numbers correspond to the number of the band in the gradient. The migration of the viral structural proteins in the gel is indicated. RI refers to the relative infectivity of TLPs and spikeless TLPs as compared with that of DLPs. The infectivities of the particles obtained from siRNA^{LamA/C}-treated cells were (ffu/ml) DLPs, 6.7×10^5 ; TLPs, 4.8×10^5 . The infectivities of the particles obtained from siRNA^{VP4}-transfected cells were (ffu/ml) DLPs, 1×10^5 ; spikeless TLPs, 4.8×10^5 ; and TLPs 9.9×10^5 . (C) EM analysis of DLPs, TLPs and spikeless TLPs purified from siRNA^{VP4}-treated cells, corresponding to bands 3, 4 and 5 of the gradient shown in (A). Magnification $\times 85\,000$. The inserts show viral particles amplified 1.5-fold. Scale bars, 90 nm.

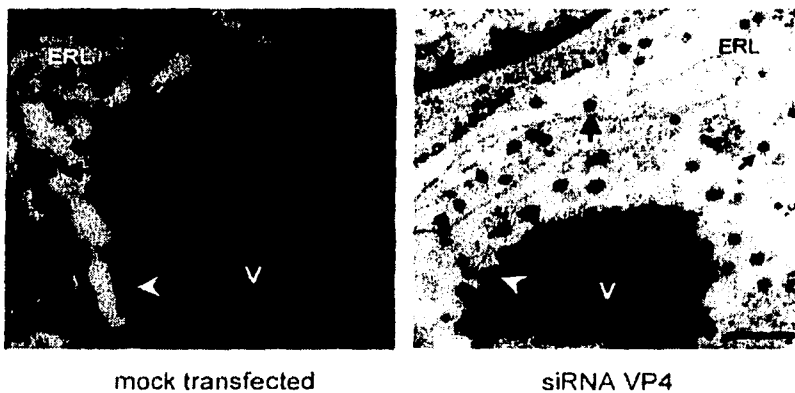


Fig. 3. Morphogenesis of RRV rotavirus particles in the presence of mock-transfected or siRNA^{VP4}-transfected MA104 cells. Dense viroplasmic inclusions (V) are abundant in the cytoplasm of rotavirus-infected cells, adjacent to the ER. From these structures DLPs bud (arrowheads) into the lumen of the ER (ERL), resulting in membrane-enveloped particles (small arrows), which later lose the membrane to produce mature triple-layered virions (large arrows). The pictures shown are representative of at least 20 different virus-infected cells. Magnification $\times 14\,000$. Scale bars, 400 nm.

M.A. Déctor *et al.*

infected in the presence of siRNA^{VP4} co-expressed both NSP5 and VP4 very likely reflects the fact that the lipofection efficiency achieved with the siRNAs was ~75%. This was estimated by determining the percentage of cells with a reduction of the nuclear signal of lamin A/C in cells treated with siRNA^{LamA/C} (data not shown). This observation is consistent with the amount of VP4 (~25% of control) detected by immunoblot in siRNA^{VP4}-treated cells (Figure 1B).

The inhibition of VP4 is specific for rotavirus RRV

To test the sequence specificity of the inhibition of VP4, cells transfected with rotavirus RRV siRNA^{VP4} were infected with the bovine rotavirus RF or the porcine rotavirus YM, whose VP4 gene sequences differ from that of RRV in five nucleotide positions at the siRNA target site (DDBJ/EMBL/GenBank accession numbers M63231 and U65924 for YM and RF, respectively). The infected cells were then immunostained as described above. In both RF- and YM-infected cells, there was a coincidence in the VP4 and NSP5 signal (shown in Figure 1C for rotavirus RF), showing the sequence specificity of the siRNA^{VP4} interference. Also, the yield of viral progeny of rotaviruses RF and YM was not reduced in cells treated with RRV siRNA^{VP4} (data not shown).

Viral particles assembled in the presence of siRNA^{VP4} lack VP4 and are poorly infectious

To evaluate the effect of reduced levels of VP4 on virus assembly, cells lipofected with siRNAs were infected with rotavirus RRV in the presence of [³⁵S]methionine, and at 24 h p.i. the virus was purified by CsCl density gradients. The virus particles obtained from cells infected in the presence of siRNA^{LamA/C} yielded, as regularly observed, two bands (bands 1 and 2 in Figure 2A), which by electrophoresis analysis corresponded to DLPs (formed by proteins VP1, VP2 and VP6) and TLPs (containing, besides the DLP components, proteins VP4 and VP7) (Figure 2B, lanes 1 and 2). In cells infected in the presence of siRNA^{VP4}, these bands (Figure 2A, bands 3 and 5; Figure 2B, lanes 3 and 5) were largely replaced by a new band (Figure 2A, band 4) of intermediate density between DLPs and TLPs. The electrophoretic protein profile of this band showed that the particles with the intermediate density have all proteins present in TLPs, except VP4 (Figure 2B, lane 4). Electron microscopy (EM) analysis of these particles (hereafter called spikeless TLPs) showed that they have a smooth surface, similar to TLPs, and clearly different from DLPs, which have a rough surface appearance (Figure 2C). These findings indicate that VP4 is not needed for the assembly of VP7, although spikeless TLPs consistently showed a larger diameter (~90 nm) than TLPs (~80 nm) and DLPs (~73 nm).

Determination of the relative infectivity of the different particles (bottom of panel 2B) showed that, whereas TLPs were ~1000-fold more infectious than DLPs, the infectivity of spikeless TLPs was similar to that of DLPs. The infectivity of the two latter types of particles is most likely the result of contaminating TLPs, since it was abolished by incubation with neutralizing antibodies to VP4 (data not shown). These results confirm the essential role of VP4 in the infectivity of the virus.

VP4 does not seem to be required for the last steps of virus morphogenesis

The ultrastructural morphology of RRV-infected cells in the presence of either siRNA^{LamA/C} or siRNA^{VP4} was examined by thin EM at 8 h p.i. (Figure 3). In both cases, typical electrodense viroplasm structures were evident in the cytoplasm in close apposition to the ER membrane. DLPs in the periphery of viroplasms were observed to bud into the lumen of the ER, leading to the formation of membrane-enveloped particles, and many of the viral particles observed within the ER had lost their lipid envelope. Given the transfection efficiency of ~75%, at least 20 siRNA^{VP4}-treated infected cells were analyzed; in all of them, abundant non-enveloped viral particles were observed within the ER. Altogether, these data suggest that VP4 is not required for the budding of DLPs into the ER or for the enveloped intermediate particles to lose their lipid envelope.

DISCUSSION

In this work, we have shown that RNAi efficiently silences the expression of the rotavirus RRV VP4 gene during infection of monkey kidney epithelial cells. This conclusion is based on the fact that, in cells transfected with siRNA^{VP4}, (i) VP4 could not be detected in a large proportion of infected cells (Figure 1C); (ii) the amount of VP4 synthesized was ~25% that of control cells (Figure 1B); (iii) the viral progeny was reduced by 75% as compared with cells transfected with siRNA^{LamA/C} (Figure 1A); and (iv) TLPs lacking VP4 were assembled (Figure 2). The fact that, in the presence of siRNA^{VP4}, VP4 was not detected in a large number of RRV-infected cells, suggests there was a complete, or nearly complete, silencing of the VP4 gene. The silencing of VP4 was not the result of a general antiviral response activated by siRNAs, since the synthesis of other viral proteins was not affected, as detected by immunoblot and immunofluorescence analyses. The specificity of the interference was corroborated by the lack of inhibition of VP4 synthesis in cells infected with rotaviruses RF and YM and by the unaffected replication of these viruses in siRNA^{VP4}-treated cells.

The findings presented in this work have allowed us to evaluate the role of VP4 in the morphogenesis of rotaviruses. In infected cells, the membrane of the ER is modified with viral glycoproteins VP7 and NSP4. VP7 is an integral protein with a luminal orientation, whereas NSP4 is a transmembrane protein, with a cytoplasmic tail that binds the DLPs assembled in the viroplasm, and drives the budding of these particles into the lumen of the ER (Estes, 1996). On the other hand, VP4 is thought to be located in the cytoplasm, possibly between the ER and the viroplasm (Petrie *et al.*, 1982; González *et al.*, 2000). It has been shown that NSP4 and VP7 form a ternary complex with VP4, which has been suggested to participate in the budding process (Maass and Atkinson, 1990). As result of this event, membrane-enveloped particles containing VP4, VP7 and NSP4, in addition to the DLP components, form (Poruchynsky and Atkinson, 1991). As the last step in the morphogenesis of the virions, the enveloped particles in the lumen of the ER lose the membrane envelope by a mechanism that is largely unknown, yielding the mature triple-layered virions. It has been suggested that a hydrophobic domain present in VP4, which is able to interact with, and permeabilize,

membranes (Dowling *et al.*, 2000) might have a role during the removal of the lipid envelope (Estes, 1996).

Our results suggest that VP4 is not required for the budding process or for the removal of the lipid membrane from the enveloped particles, since both enveloped and non-enveloped viruses were observed by EM inside the lumen of the ER in cells treated with siRNA^{VP4}, and non-enveloped particles containing VP7, but not VP4, were purified from these cells. Finally, the fact that spikeless TLPs were formed efficiently clearly show that the assembly of VP7 on DLPs is a process independent of the assembly of VP4. However, the larger diameter of the spikeless TLPs as compared with TLPs suggests that, in the absence of VP4, VP7 assembles in a loose manner, probably different from its organization on infectious virions, or that VP4 is needed to tighten the structure of the viral particle.

The highly specific and efficient silencing of rotavirus gene expression by RNAi is remarkable given the highly lytic and rapid replication cycle of the virus, which is completed in ~12 h, and it opens up the possibility of carrying out reverse genetics in mammalian dsRNA viruses to study gene function, a task that has been elusive for a long time in the field. The specific antiviral effect of siRNA was first demonstrated by Bitko and Barik (2001) in respiratory syncytial virus. Subsequently, such effects were reported in poliovirus (Gitlin *et al.*, 2002) and human immunodeficiency virus (Lee *et al.*, 2002; Novina *et al.*, 2002). Thus, the inhibition of viral gene expression by siRNAs offers the potential for a novel therapeutic approach for rotavirus and other virus infections, once efficient methods for *in vivo* delivery of siRNAs are developed.

METHODS

Cells, viruses and antibodies. The rhesus monkey epithelial cell line MA104 was grown in Eagle's minimal essential medium (MEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and was used for all experiments carried out in this work. Rhesus rotavirus RRV was obtained from H.B. Greenberg (Stanford University, Stanford, CA); bovine rotavirus RF was kindly provided by J. Cohen (INRA, Jouy-en-Josas, France); porcine rotavirus YM was isolated in our laboratory. All rotavirus strains were propagated in MA104 cells as described previously (Pando *et al.*, 2002). mAbs to VP2 (mAb 3A8) and VP4 (mAb HS2) were kindly provided by H.B. Greenberg. Rabbit polyclonal serum to NSP5 has been described previously (González *et al.*, 2000).

siRNAs sequence and transfection. siRNA^{VP4} had the sequence ucuagguccuuuugcucaatt (sense), uugagrcaaaaggaccuagatt (anti-sense), corresponding to nucleotides 117–135 of the RRV VP4 gene (DDBJ/EMBL/GenBank accession number AY033150). The sequence of siRNA^{LaminC} has been reported previously (Elbashir *et al.*, 2001). The siRNAs were obtained from Dharmacon Research (Lafayette, CO), as annealed duplexes. Transfection of siRNAs was carried out in nearly confluent cell monolayers using 3 µl of oligofectamine (Invitrogen) per 100 µl of siRNAs at 600 pmol/ml in MEM. The transfection mixture was added to cells previously washed with MEM and incubated for 2–3 h at 37°C. After this time the transfection mixture was removed, and the cells were washed with MEM and kept in this medium for 72 h at 37°C before virus infection, except where a different time is indicated.

Infection of cells and titration of viral progeny. Cell monolayers, in 12- or 24-well plates, were infected with 0.5 virus focus forming units (ffu) per cell, as described previously (Pando *et al.*, 2002), and then incubated for 12 h at 37°C. At this time the cells were then lysed by two freeze-thaw cycles, and the lysates were treated with 10 µg/ml of trypsin for 30 min at 37°C. The infectious titer of the viral preparations was obtained by an immunoperoxidase focus assay (Pando *et al.*, 2002).

Immunoblots. Cells were transfected with siRNAs and infected with rotavirus RRV as described above. At the indicated times p.i. the cells were lysed, the proteins separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose. The transferred proteins were incubated with a mixture of mAbs 3A8 to VP2 and HS2 to VP4, and the bound antibodies were developed by incubation with a peroxidase-labeled anti-mouse immunoglobulin (Ig) (Zymed) and the Western Lightning system (Perkin-Elmer).

Immunofluorescence. Eight hours p.i. the cells were fixed with 2% paraformaldehyde and permeabilized with 0.5% Triton X-100. The cells were then incubated with a mixture of mAb HS2 and rabbit polyclonal serum to NSP5, followed by staining with goat anti-mouse IgG coupled to Alexa 488 and goat anti-rabbit IgG coupled to Alexa 568 (Molecular Probes). Lamin A/C was detected with mAb 636 (Santa Cruz Biotechnology). The slides were analyzed with a Bio-Rad MRC-600 confocal microscope and CoMOS MPL-1000 software.

Radiolabeling, isolation and analysis of viral particles. Cells grown in 75 cm² flasks were transfected with the indicated siRNA and then infected with 1 ffu of rotavirus RRV per cell; viral proteins were labeled for 18 h with 50 µCi/ml [³⁵S]methionine (Dupont NEN) beginning at 3 h p.i. The viral particles were purified by isopycnic CsCl ultracentrifugation, as described previously (Pando *et al.*, 2002). The opalescent bands corresponding to the different types of particles were collected by puncture, and the protein composition of each band analyzed by SDS-PAGE and fluorography. To determine the infectivity of each fraction, CsCl was removed by desalting-centrifugation on Sephadex G-25, the virus was activated with trypsin, and the infectious titer was determined as described above.

Electron microscopy. Cells transfected with siRNA^{VP4} or mock-transfected were infected with 0.5 ffu of rotavirus RRV per cell, and 8 h p.i. the cells were detached from the culture plates, fixed in 2.5% glutaraldehyde/0.1 M cacodylate, embedded in LR-white resin and postfixed with 1% osmium tetroxide. Thin sections obtained were stained with 0.5% uranyl acetate/1% lead citrate. To analyze the purified virus particles, the fractions were desalted as described above, and a drop was applied to a carbon-coated copper grid and then negative stained with uranyl acetate. The grids were examined in a Zeiss EM-900 electron microscope at 80 kV.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Xóchitl Alvarado and Lorena López for their excellent technical assistance with the confocal and electron microscopes, respectively. This work was partially supported by grants 55000573 and 55000613 from the Howard Hughes Medical Institute, G37621N from Conacyt and 262-M from Conacyt-SSA, Mexico.

REFERENCES

- Bitko, V. and Barik, S. (2001) Phenotypic silencing of cytoplasmic genes using sequence-specific double-stranded short interfering RNA and its application in the reverse genetics of wild type negative-strand RNA viruses. *BMC Microbiol.*, **1**, 34–44.
- Caplen, N.J., Parrish, S., Imani, F., Fire, A. and Morgan, R.A. (2001) Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **98**, 9742–9747.
- Dowling, W., Denisova, E., LaMonica, R. and Mackow, E.R. (2000) Selective membrane permeabilization by the rotavirus VP5* protein is abrogated by mutations in an internal hydrophobic domain. *J. Virol.*, **74**, 6368–6376.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. and Tuschl, T. (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, **411**, 494–498.
- Estes, M.K. (1996) Rotaviruses and their replication. In Fields, B.N. et al. (eds), *Virology*. Raven Press, New York, Vol. 2, pp. 1625–1655.
- Gitlin, L., Karelsky, S. and Andino, R. (2002) Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells. *Nature*, **418**, 430–434.
- González, R.A., Espinosa, R., Romero, P., López, S. and Arias, C.F. (2000) Relative localization of viroplasmic and endoplasmic reticulum-resident rotavirus proteins in infected cells. *Arch. Virol.*, **145**, 1963–1973.
- Hannon, G.J. (2002) RNA interference. *Nature*, **418**, 244–251.
- Lee, S.N., Dohjima, T., Bauer, G., Li, H., Li, M.-J., Ehsani, A., Salvaterra, P. and Rossi, J. (2002) Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 *rev* transcripts in human cells. *Nat. Biotech.*, **19**, 500–505.
- Mauss, D.R. and Atkinson, P.H. (1990) Rotavirus proteins VP7, NS28, and VP4 form oligomeric structures. *J. Virol.*, **64**, 2632–2641.
- Novina, C.D. et al. (2002) siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection. *Nat. Med.*, **8**, 681–686.
- Pando, V., Isa, P., Arias, C.F. and López, S. (2002) Influence of calcium on the early steps of rotavirus infection. *Virology*, **295**, 190–200.
- Petrie, B.L., Graham, D.Y., Hanssen, H. and Estes, M.K. (1982) Localization of rotavirus antigens in infected cells by ultrastructural immunocytochemistry. *J. Gen. Virol.*, **63**, 457–467.
- Poruchynsky, M.S. and Atkinson, P.H. (1991) Rotavirus protein rearrangements in purified membrane-enveloped intermediate particles. *J. Virol.*, **65**, 4720–4727.
- Sharp, P.A. (2001) RNA interference-2001. *Genes Dev.*, **15**, 485–490.
- Zamore, P. (2001) RNA interference: listening to the sound silence. *Nat. Struct. Biol.*, **8**, 746–750.

DOI: 10.1093/embo-reports/kvf234

RESULTADOS COMPLEMENTARIOS

Funcionalidad de la RNAi en las células MA104

Inicialmente se evaluó la factibilidad del uso de los RNAs interferentes (siRNAs) en la línea celular donde se replican los rotavirus (MA104), empleando un siRNA descrito por el grupo de Thomas Tuschl (41), dirigido contra las laminas A/C humanas y que probó ser efectivo en inhibir la síntesis de estas proteínas en la línea celular HeLa. Las laminas A/C son proteínas que se localizan en la membrana nuclear y tienen un recambio relativamente rápido, de aproximadamente 48 h (42, 71). No son proteínas esenciales ya que su eliminación no afecta la viabilidad de la célula.

Cuando las células MA104 se lipofectaron con el siRNA^{LamA/C}, se hizo una cinética de inhibición a 24, 48 y 72h p.l.f. Al cabo de cada tiempo se observó la señal nuclear de las laminas por inmunofluorescencia (**Figura 9**). La observación de las preparaciones bajo el microscopio confocal mostró que en aproximadamente el 75% de las células, la señal de las laminas fue de mucho menor intensidad que las del control (lipofectadas sólo con oligofectamina o sin lipofectar).

Aunque nunca se logró abatir totalmente la traducción de las laminas, como se describió originalmente que puede ocurrir en las células HeLa, sí se demostró un efecto inhibitorio desde las 24 horas, siendo mejorado a las 48 y máximo a las 72h p.l.f. del siRNA^{LamA/C}. Esto demostró que sí era posible aplicar esta tecnología en células MA104, deduciéndose simultáneamente la eficiencia de la lipofección de los siRNAs que se podía esperar en estas células y que es de aproximadamente 75%.

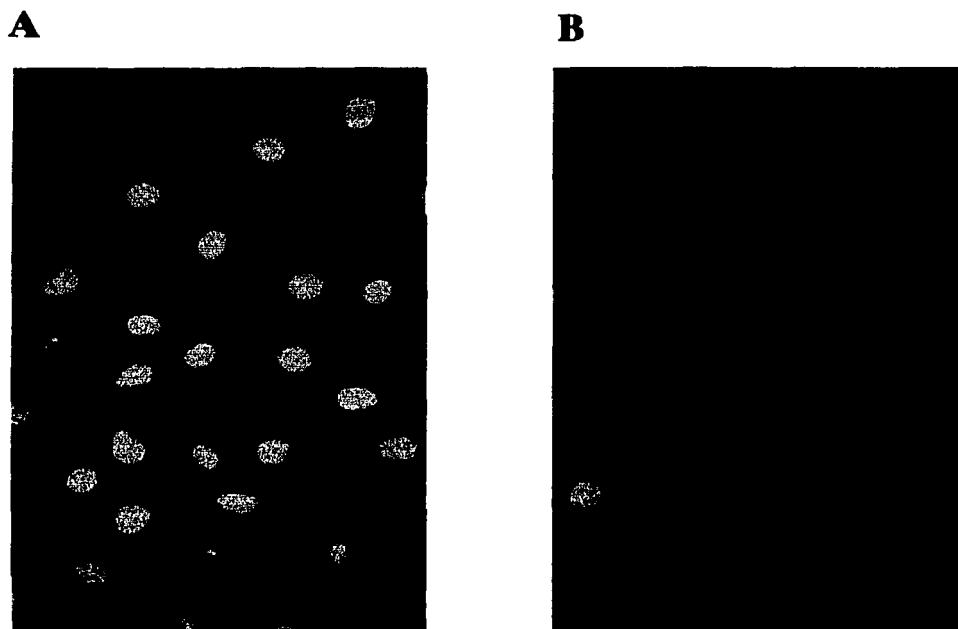


Figura 9. Probando el sistema de siRNAs en las células MA104. Se muestran 2 inmunofluorescencias de células MA104 vistas por microscopía confocal. A) Células control transfectadas solo con oligofectamina. B) Células transfectadas con el siRNA ^{LamA/C}. Se aprecia la disminución de la intensidad en la señal nuclear de la LamA/C en B), con respecto al control A). La eficiencia de transfección es aproximadamente del 75% (núcleos disminuidos en intensidad).

TECNOLOGÍA CON
FALLA DE ORIGEN

Silenciamiento de la proteína VP4 mediante el sistema de RNAi

Para probar la capacidad de los siRNAs para inhibir la expresión de genes de rotavirus, se diseñó un siRNA (siRNA^{VP4}) dirigido contra el gen 4 de la cepa de rotavirus RRV, que codifica para la proteína estructural VP4. El silenciamiento de este gen estructural pudiera provocar un fenotipo predecible y totalmente explorable (como se demuestra posteriormente), por lo que es un gen adecuado para usarse como modelo para probar la RNAi en el sistema de rotavirus.

Se emplearon tres tipos de ensayos para demostrar la funcionalidad del sistema para inhibir específicamente la síntesis de la proteína VP4 del rotavirus RRV:

1. Rendimiento viral:

El rendimiento viral fue el primer criterio que se usó para apreciar el efecto general de la posible inhibición de una proteína estructural, es decir, se esperaba establecer una relación inversa entre el número de partículas infecciosas y la inhibición de la proteína VP4.

El título viral encontrado en presencia del siRNA^{VP4} fue de alrededor de un 25% de las partículas infecciosas producidas en las células control (Figura 1A del artículo). Esto sugería que la disminución en el rendimiento viral se pudiera deber a la disminución de VP4, que ocasionaba la producción de partículas con menos espículas (o ninguna) y por lo tanto no infecciosas, o que simplemente no se podían ensamblar las partículas de triple capa al interrumpir algún paso en la morfogénesis viral.

El hecho de que se inhibiera un ≈75% la progenie viral y que la eficiencia de transfección demostrada en MA104 con el siRNA^{lamA/C} fuera de este orden, sugirió que la inhibición de la síntesis de VP4 en las células transfectadas había sido eficiente. Para probar el efecto inhibitorio del siRNA^{VP4} sobre su proteína blanco, se detectó la proteína viral por inmunoblot e inmunofluorescencia, tal y como se describe a continuación:

2. Inmunoblot

Una manera más directa de observar el efecto inhibitorio del siRNA^{VP4} fue estimando la cantidad relativa de los niveles de VP4 en las células infectadas, en presencia y en ausencia del siRNA^{VP4}, mediante ensayos de tipo Western blot. Para esto se usaron células a 72h p.l.f. de siRNAs (ver en el punto 3 acerca del tiempo p.l.f.), que se lisaron a diferentes tiempos p.i., para tener una cinética de acumulación de la proteína VP4. Para detectar la proteína VP4 se usó un anticuerpo monoclonal (HS2). Con otro anticuerpo monoclonal (3A8) se detectó a la proteína VP2 como control interno.

Una vez realizados los ensayos tipo Western blot y después de cuantificar por densitometría las señales correspondientes a las dos proteínas, se obtuvieron los cocientes VP2/VP4 para los tiempos 9 y 12h p.i., ya que la cantidad de ambas proteínas no fue detectable en los tiempos 3 y 6h p.i., probablemente porque a estos tiempos no se ha acumulado suficiente cantidad para ser revelada por este método (Figura 1B del artículo y Tabla I).

Tabla I
Densitometría del inmunoblot para las proteínas VP2 y VP4

siRNA	VP 4		Lam A/C		NSP5	
	9h	12h	9h	12h	9h	12h
VP2/VP4	3.6	5.2	1.5	1.3	1.7	1.2

La cuantificación de las bandas indicó que mientras en las células MA104 control (transfectadas con el siRNA^{LamA/C}) el cociente a las 9 y 12h p.i. era de 1.5 y 1.3; en las células transfectadas con el siRNA^{VP4}, los cocientes VP2/VP4 fueron de 3.6 y 5.2 a los mismos tiempos. Esto indica que el sistema interferente es cada vez más eficiente en inhibir la traducción de VP4 conforme avanza la infección. La división de los cocientes de los controles (siRNA^{LamA/C} o siRNA^{NSP5}) sobre el cociente de siRNA^{VP4} a las 12h p.i. muestra que la proteína VP4 se acumula 4 ó 4.3 veces menos en presencia del siRNA^{VP4} que en los controles.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En estos ensayos, la proteína VP4 cuantificada incluye tanto las células transfectadas como las que no se transfectaron con el siRNA^{VP4}, y por lo tanto el que se acumule sólo la cuarta parte, coincide nuevamente con la eficiencia de transfección de los siRNAs estimada en ≈75%.

3. Inmunofluorescencia

Otra manera de apreciar el efecto de inhibición inducido por el siRNA^{VP4}, consistió en detectar la proteína VP4 producida en cada célula individual infectada con rotavirus. Los ensayos de inmunofluorescencia realizados cumplen este requerimiento, y aunque este ensayo es únicamente cualitativo, resulta muy informativo ya que proporciona un panorama general de lo que sucede con la síntesis de la proteína VP4 en toda la población celular lipofectada con el siRNA^{VP4} e infectada con rotavirus.

Las inmunofluorescencias de células MA104 lipofectadas durante 72h con el siRNA^{VP4} indicaron que aproximadamente en el 75% de las células que estaban infectadas con el rotavirus (presentaban la señal en rojo correspondiente a NSP5), no se pudo apreciar la señal verde correspondiente a la proteína VP4. El 25% de células infectadas restantes tenían los dos tipos de señales verde y roja a niveles comparables a los controles (Figura 1C del artículo).

Otro tipo de hallazgo proporcionado por las inmunofluorescencias, es que la inhibición a 24h p.l.f. con el siRNA^{VP4}, fue menor que a las 72h p.l.f (Figura 10), sugiriendo que la interferencia de VP4 en el cultivo celular es más eficiente cuando las células se incuban por más tiempo con el siRNA^{VP4}.

La intensidad de VP4 por inmunofluorescencia fue tan baja a 72h p.l.f., que se puede considerar un inhibición total para aproximadamente el 75% de las células. Parece interesante explorar por qué a 72h p.l.f. la señal de interferencia parece estar más activa o potenciada, puesto que se ha establecido que las células de mamífero carecen de algún mecanismo de amplificación de la interferencia, como el mediado por la RNAPol en los eucariontes inferiores (71, 73, 90).

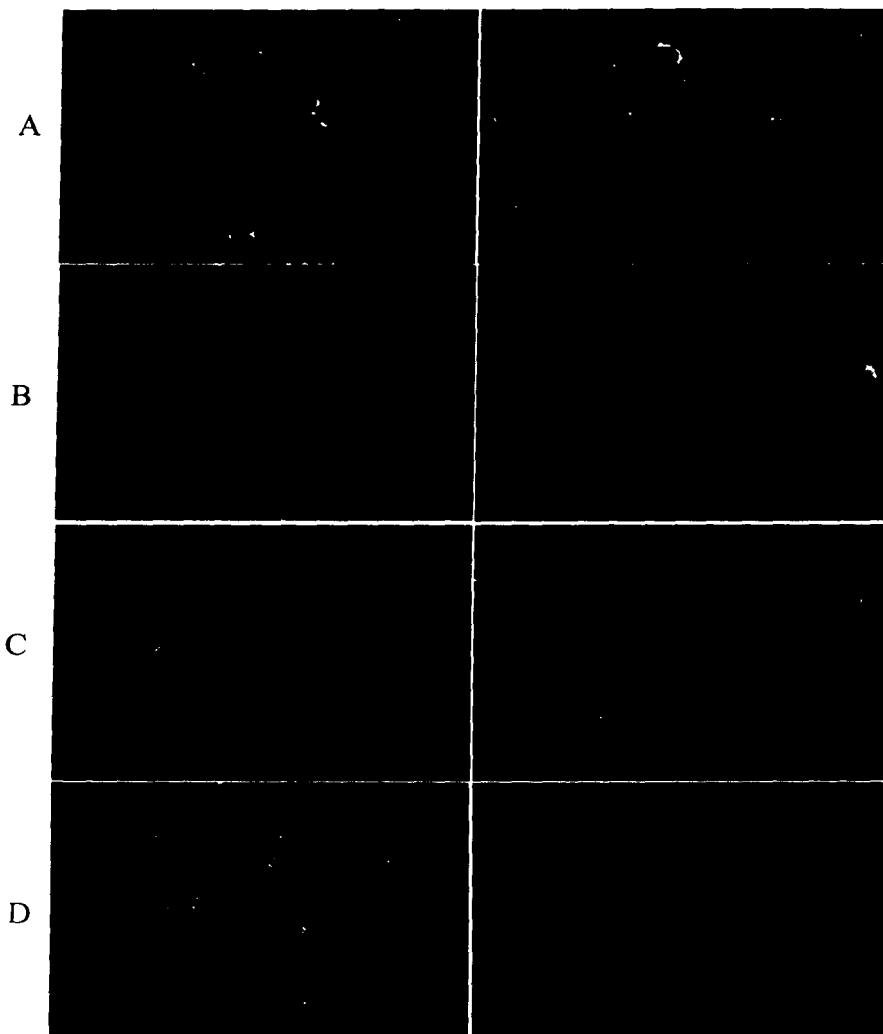


Figura 10. Comparación de la eficiencia de interferencia de VP4 a diferentes tiempos. Se muestran las inmunofluorescencias para NSP5 como control interno y VP4 como la proteína en análisis, según se indica. A) y B) Células a 24 h p.i.f. con el siRNA^{LamA/C} o con el siRNA^{VP4}, respectivamente. C) y D) Células a 72 h p.i.f. con el siRNA^{LamA/C} o con el siRNA^{VP4}, respectivamente. Se aprecia la diferencia de intensidad entre la señal de VP4 a 24 y a 72h (VP4, B y D) siendo ausente en la mayoría de las células infectadas a 72h p.i.f. (VP4, D), mientras NSP5 fue comparable entre los controles A) y C).

Los resultados de las inmunofluorescencias junto con los de rendimiento viral, y los de los inmunoblots, apoyan que el siRNA^{VP4} sea el responsable de la inhibición de VP4. De acuerdo al porcentaje de ≈75% de eficiencia de transfección del siRNA, el ≈25% de células con cantidades normales de VP4 corresponde aparentemente a células no transfectadas (**Figura 10** y **Figura 1C** del artículo). En este caso, el uso de NSP5 como control interno fue muy útil, ya que su presencia muestra que el efecto de inhibición es específico para VP4 y no se debe a una inhibición generalizada de las proteínas virales por algún sistema inespecífico de la célula, como los de PKR o RNasa L, que se mencionaron anteriormente.

Especificidad del siRNA^{VP4}

Para probar la especificidad del siRNA^{VP4} sobre su blanco (proteína VP4), se hicieron inmunofluorescencias de células MA104 infectadas con rotavirus RRV, pero usando a NSP2 o NSP3 como control interno. En estos ensayos básicamente se obtuvieron los mismos resultados que cuando se empleó NSP5 como control, es decir, hubo inhibición de la proteína VP4 en aproximadamente el 75% de las células lipofectadas con el siRNA^{VP4} y no se observó inhibición de las otras proteínas virales (**Figura 11**). Esto corrobora que la inhibición de VP4 es específica para su mensajero y no se debe a un efecto generalizado sobre los RNAs de rotavirus, o a la inhibición de la traducción general de las proteínas celulares.

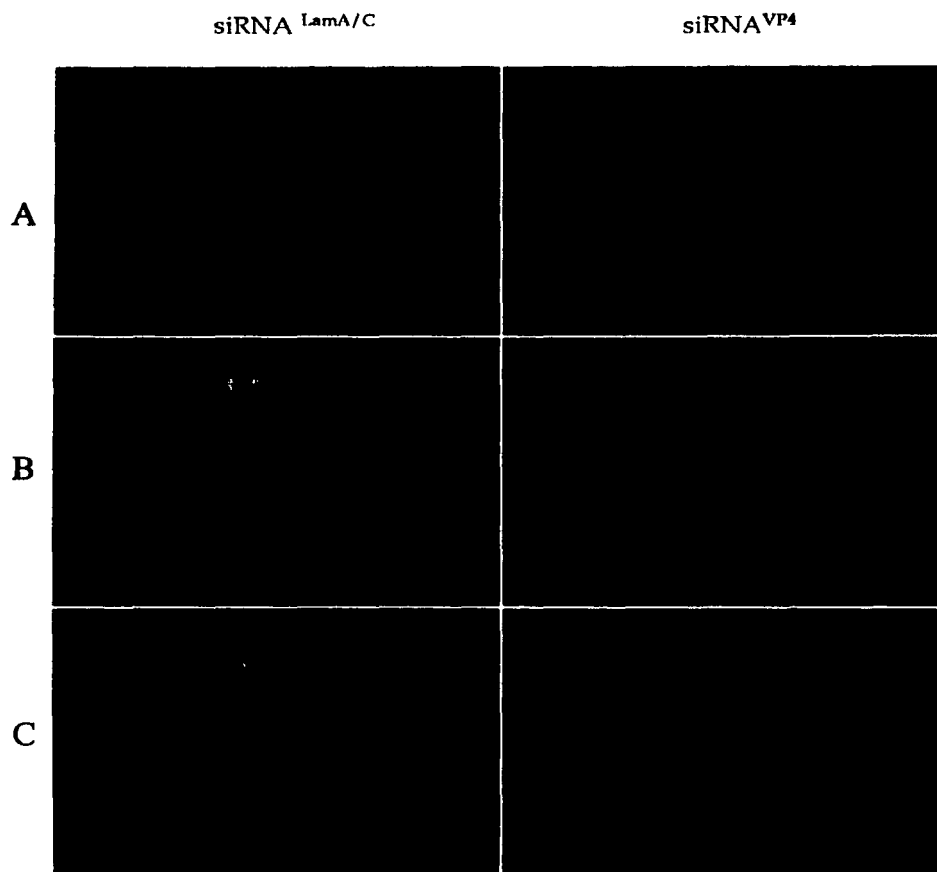


Figura 11. Empleo de las proteínas NSP2 y NSP3 como controles internos. Se muestra en rojo el control interno (A), en verde la proteína VP4 (B) y la sobreposición de las imágenes (C). Solo se incluye el contraste de fases de la preparación de NSP2 (D). No fue afectada la síntesis de NSP2 o de NSP3 por el siRNA^{VP4} y por lo tanto sólo se observa el efecto interferente sobre VP4. Las imágenes corresponden a inmunofluorescencias de células MA104 a 72h p.l.f. con el siRNA^{VP4} y 8h p.i. con una moi de 0.5 del rotavirus RRV, tomadas con el objetivo 40X.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los ensayos anteriores sugieren que en cada célula transfectada con el siRNA^{VP4}, la proteína VP4 se inhibe a niveles por debajo del límite de detección de la inmunofluorescencia y además, que en estas células no parecen producirse partículas infecciosas. Todos estos ensayos se hicieron infectando las células MA104 con la cepa RRV cuya secuencia del segmento 4, fue el blanco para el diseño del siRNA^{VP4}.

Para evaluar el efecto de variaciones en la secuencia blanco, sobre la especificidad de la inhibición de la síntesis de VP4, se probó el efecto del siRNA^{VP4} sobre la síntesis de las proteína ortólogas de cepas diferentes a RRV, que difieren en 5 posiciones en la región del segmento 4 reconocido por el siRNA^{VP4} (Tabla II).

TABLA II
COMPARACION DE LA REGION siRNA^{VP4} EN CEPAS DE ROTAVIRUS

CEPA	SECUENCIA	POSICION	Genebank
RRV	5' -AAUCUAGGUCCUUUUGCUCAA-3'	115-135	AY033150
RF	----C---A--G--C--G---	115-135	U65924
YM	----CU-----A--C--G---	115-135	M63231

Cuando se utilizaron las cepas de rotavirus YM (porcino) y RF (bovino) en los mismos tres tipos de ensayos, no se observó la inhibición de la síntesis de las VP4 heterólogas (Figuras 12, 13 y 1C del artículo). En los inmunoblots de células infectadas con los rotavirus YM y RF, se usó como control interno a la proteína no estructural NSP2 en sustitución de la proteína VP2, ya que el anticuerpo monoclonal 3A8 usado para RRV no reconoce a la VP2 de estas otras cepas. En ambas cepas la VP4 se acumuló a niveles comparables a los controles (siRNA^{LamA/C} y siRNA^{NSP5}), como se observa en la Figura 13 A.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Los ensayos de inmunofluorescencia con células MA104 infectadas tanto con el rotavirus RF como aquellas infectadas con la cepa YM, no mostraron la inhibición de la proteína VP4 de estos virus por el siRNA^{VP4} de RRV (Figura 12 y figura 1C del artículo). Todas las células que expresaron la proteína estructural NSP5 (tomadas como células infectadas) también expresaron niveles normales de VP4 y esto sucedió tanto en las células control lipofectadas con el siRNA^{LamA/C} (control) como en las lipofectadas con el siRNA^{VP4}. La presencia de ambas señales esperadas para cada proteína viral indicó que el siRNA^{VP4} fue incapaz de inhibir a la VP4 de las cepas de rotavirus YM y RF, es decir, el efecto es específico de la cepa RRV.

En el tercer y último tipo de ensayo se buscó algún posible efecto general sobre la síntesis de la progenie viral de ambos rotavirus (YM y RF), por lo que se titularon los virus generados a 12h p.i. de células infectadas con RF o YM y tratadas tanto con el siRNA^{VP4} como con el siRNA^{LamA/C}. Los títulos obtenidos para las células tratadas con el siRNA^{VP4} fueron similares a los que se encontraron en las células lipofectadas con el siRNA^{LamA/C} (Figura 13B).

Con estos resultados se demostró de manera conclusiva que el siRNA^{VP4} tiene una especificidad absoluta por el RNAm de la proteína VP4 de la cepa RRV y no afecta la síntesis de VP4 de las cepas que difieren en 5 posiciones en secuencia a la VP4 de RRV, como se esperaba para un sistema considerado de alta especificidad, como es la RNAi.

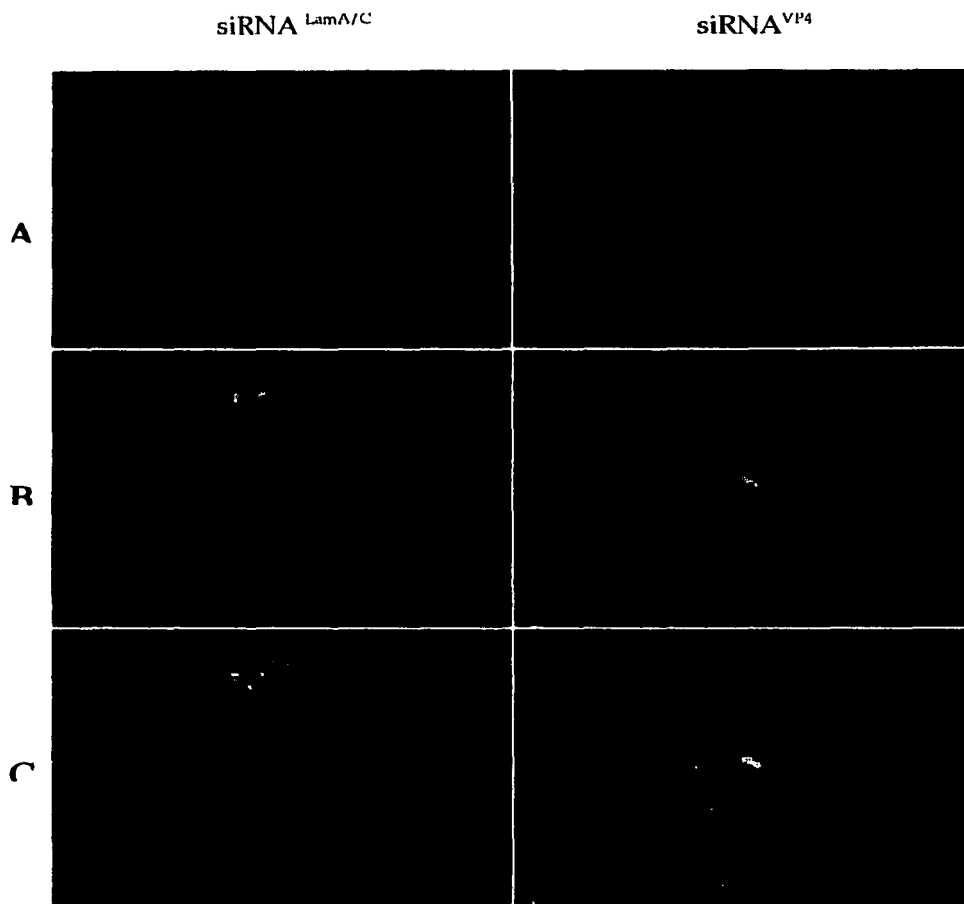
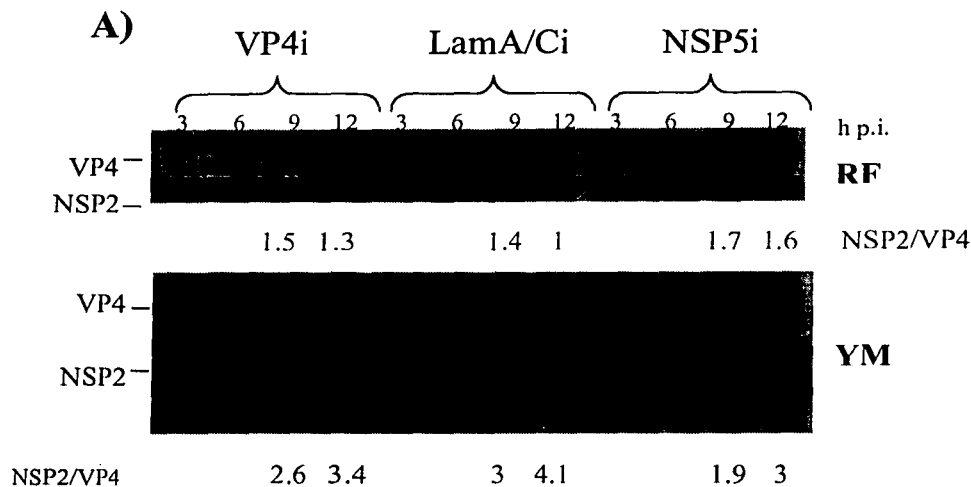


Figura 12. El siRNA^{VP4} no interfiere la síntesis de la proteína VP4 de la cepa de rotavirus YM. Se muestran las inmunofluorescias correspondientes a 72h p.l.f. con el siRNA^{LamA/C} o con el siRNA^{VP4} e infectadas con el rotavirus YM a una moi de 0.5. Las células muestran el mismo patrón de fluorescencia en presencia cualquier siRNA, detectándose tanto la proteína NSP5 usada como control interno (A) como la proteína VP4 (B), indicando que el siRNA^{VP4} de RRV no inhibe la síntesis de la VP4 de YM. C) Sobreposición de las imágenes en A) y en B). Notese la heterogeneidad de la expresión de ambas proteínas en las diferentes células.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



B)

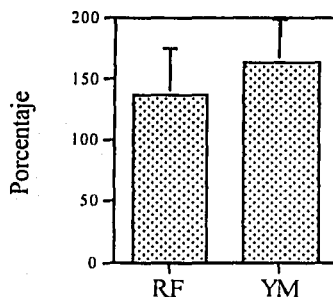


Figura 13. El siRNA^{VP4} no afecta a los rotavirus de las cepas de rotavirus RF y YM en dos tipos de ensayos. A) Se muestra un Western blot representativo de proteínas provenientes de células transfectadas con tres siRNAs. Se detectaron las proteínas VP4 y NSP2 a los cuatro tiempos indicados. Se muestran los cocientes NSP2/VP4 para cada tiempo. Los cocientes son similares a los mismos tiempos con los tres siRNAs, demostrando que el siRNA^{VP4} no afecta la síntesis de la VP4 de estas cepas de rotavirus. B) Rendimiento viral de las cepas RF y YM en células MA104 transfectadas 72h con el siRNA^{VP4} de RRV o el siRNA^{LamA/C}, ajustados al control de lipofección sin siRNA. Los títulos corresponden a tres ensayos diferentes. RF 136% ± 37.8 y YM 163.1% ± 34.4.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Caracterización de las partículas glabras

Los gradientes de CsCl muestran una nueva clase de partículas virales

Los hallazgos descritos anteriormente sugieren que en aproximadamente 75% de las células transfectadas con el siRNA^{VP4}, se abate considerablemente la síntesis de la proteína VP4 con la consecuente reducción en la producción de virus infecciosos. Esta disminución en la síntesis de la progenie viral pudiera deberse a que no se estuvieran ensamblando las partículas completas (TLPs) por una alteración en la morfogénesis debido a la falta de VP4. Como se mencionó en la introducción, se ha propuesto que VP4 forma un complejo heterotrimérico junto con las proteínas VP7 y NSP4 en la membrana del RE, el cual pudiera ser el receptor de las DLPs formadas en los viroplasmos, para que estas gemen hacia el lumen del RE. De acuerdo a esto, se esperaba que en los cultivos infectados en presencia del siRNA^{VP4}, se disminuyera la cantidad de TLPs y tal vez se acumulara una mayor cantidad de DLPs.

Para verificar esta hipótesis, se aislaron en un gradiente de densidad de CsCl las partículas que se generaron en las células lipofectadas con el siRNA^{VP4} e infectadas con el rotavirus RRV. Se marcaron metabólicamente las proteínas virales con (³⁵S)-Met durante la infección

Adicionalmente a las dos bandas típicas que se observan en un gradiente (DLPs y TLPs de 1.38 y 1.36 g/cm³ de densidad, respectivamente), en la presencia del siRNA^{VP4} se observó una banda en posición cercana a las TLPs (Figura 2A del artículo), cuya intensidad resultó considerablemente mayor que la de las DLPs o las TLPs. Esta observación fue consistente en 4 ensayos realizados independientemente (Figura 14).

La presencia de la banda adicional sugiere la formación de partículas virales diferentes a las dos clases de partículas conocidas.

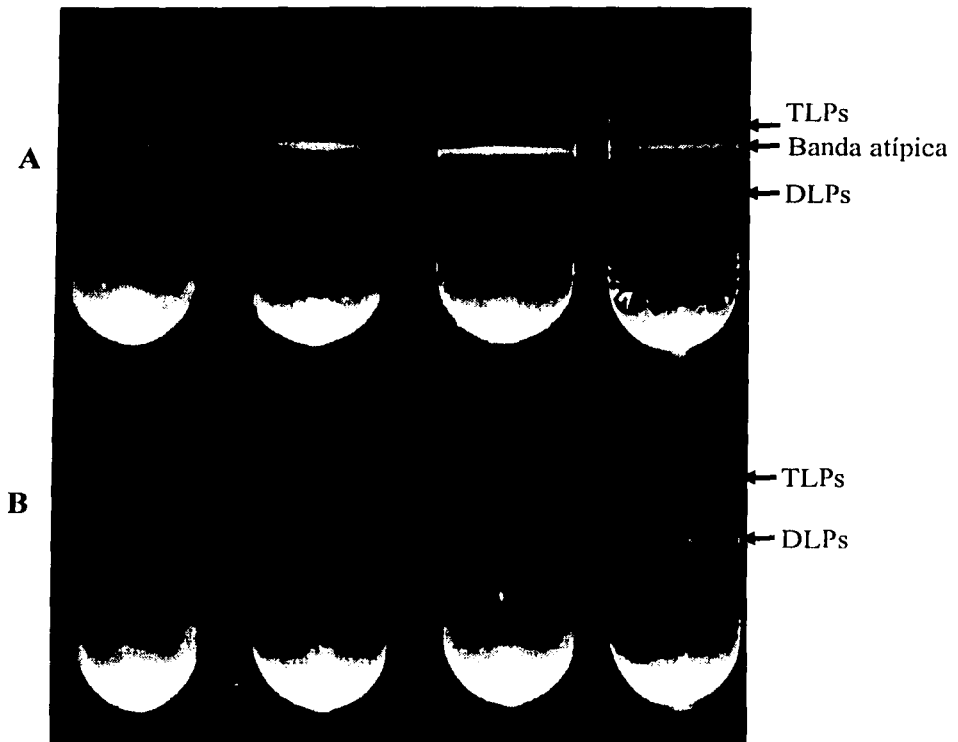


Figura 14. Gradientes de CsCl de partículas virales generadas en presencia del siRNA^{VP4}. Se muestra la reproducibilidad de la presencia de la banda extra cuando se infectan células MA104 en presencia del siRNA^{VP4} (A), en contraste con las dos bandas de los controles siRNA^{LamA/C} (B).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Las nuevas partículas son TLPs sin VP4

La composición de proteínas de cada una de las tres bandas obtenidas en el gradiente de CsCl se analizó por electroforesis en gel de poliacrilamida y autoradiografía.

Como se muestra en la **Figura 2B** del artículo; la banda de mayor densidad (carriles 1 y 3) que contiene a las proteínas VP1, VP2 y VP6, corresponde a DLPs, mientras que la banda de menor densidad (carriles 2 y 5), contiene además las proteínas VP7 y VP4, y por lo tanto corresponde a TLPs. Las partículas de la banda con densidad intermedia (carril 4), contuvieron todas las proteínas de las TLPs excepto la proteína VP4, indicando que VP4 no es esencial para que se ensamble la capa externa formada de VP7. A estas partículas les llamamos "partículas glabras" (referidas en el artículo como "spikeless").

Las partículas glabras no son infecciosas

Determinada la identidad de las partículas en la banda atípica, se exploró la infectividad de estas TLPs carentes de la proteína VP4. Para ello se determinó el título de partículas infecciosas de cada banda proveniente del gradiente de células tratadas con el siRNA^{VP4}. Como indican los valores de infectividad relativa referida en la **Figura 2B** del artículo, la infectividad correspondiente a las partículas glabras fue 990 veces menor que la de las TLPs y sólo 5 veces más infecciosas que las DLPs. El hecho de que la infectividad de las partículas glabras fuera muy similar a la de las DLPs, confirma que VP4 es necesaria para la infectividad de los rotavirus. No se descarta que estas partículas tengan algunas espículas de VP4, pero en cantidad insuficiente tanto para ser detectada en los geles, como para conferir la infectividad.

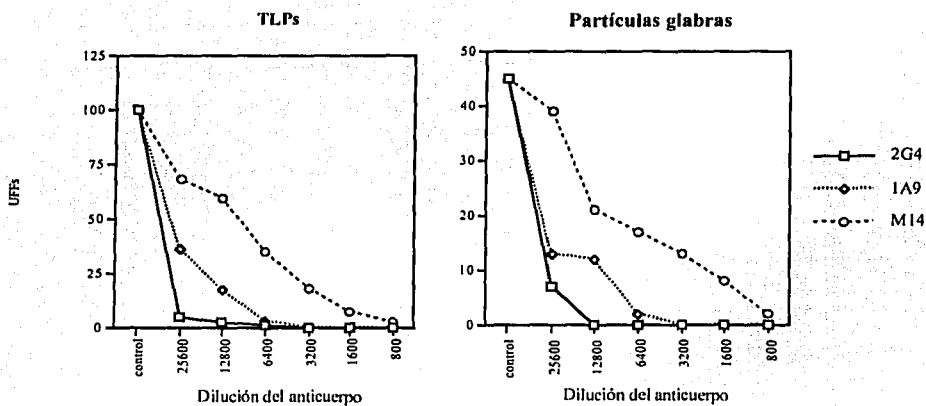


Figura 15. **Curvas de neutralización de las partículas glabras.** Los tres anticuerpos monoclonales neutralizantes utilizados (2G4, 1A9 y M14) están dirigidos hacia la proteína VP4. Los datos se muestran como uffs, no como cantidad de partículas o concentración de proteínas. Se inició con 50 uffs (12500 uffs/ml) para las partículas glabras y con 100 uffs para las TLPs (25000 uffs/ml).

FFSIS CON
FALLA DE ORIGEN

Dado que se ha reportado que las DLPs no son infecciosas, para confirmar que la infectividad encontrada en las partículas glabras y en las DLPs probablemente resulta de la contaminación con TLPs, se realizaron ensayos de neutralización con tres anticuerpos monoclonales que reconocen a VP4. Como se muestra en la Figura 15, las pendientes de las curvas de infectividad disminuyeron de manera similar tanto para las partículas glabras como para las TLPs, siendo igualmente sensibles a la neutralización principalmente por el anticuerpo 2G4. La neutralización con estos tres anticuerpos demostró que la VP4 es esencial para la infectividad y como esta proteína no forma parte estructural ni de las DLPs ni de las partículas glabras, entonces se concluye que la infectividad observada se debe a TLPs contaminantes de ambas bandas, que pudieran tener el juego completo de 60 espículas de VP4, o un número menor de ellas, pero suficiente para que la partícula sea infecciosa.

La contaminación de las partículas glabras con TLPs se pudo hacer más evidente cuando se fraccionó muy finamente (3 gotas) el gradiente de células lipofectadas con el siRNA^{VP4} e infectadas con RRV (Figura 16). Las fracciones se sometieron a electroforesis para revelar la identidad de las partículas virales por medio del contenido protéico determinando el título de partículas infecciosas en cada una de ellas.

Se observó que los picos máximos de concentración de partículas virales correspondieron; la fracción 16 para las DLPs, la fracción 22 para las partículas glabras y la fracción 32 para las TLPs. La infectividad en el gradiente fue aumentando hacia las fracciones conteniendo TLPs, mientras que las fracciones correspondientes a partículas DLPs y las primeras fracciones identificadas como partículas glabras, tuvieron infectividades muy bajas. Este tipo de fraccionamiento y caracterización de las partículas a lo largo del gradiente, junto con los ensayos de neutralización, demuestran que muy probablemente durante el fraccionamiento del gradiente las TLPs pueden contaminar incluso a las DLPs.

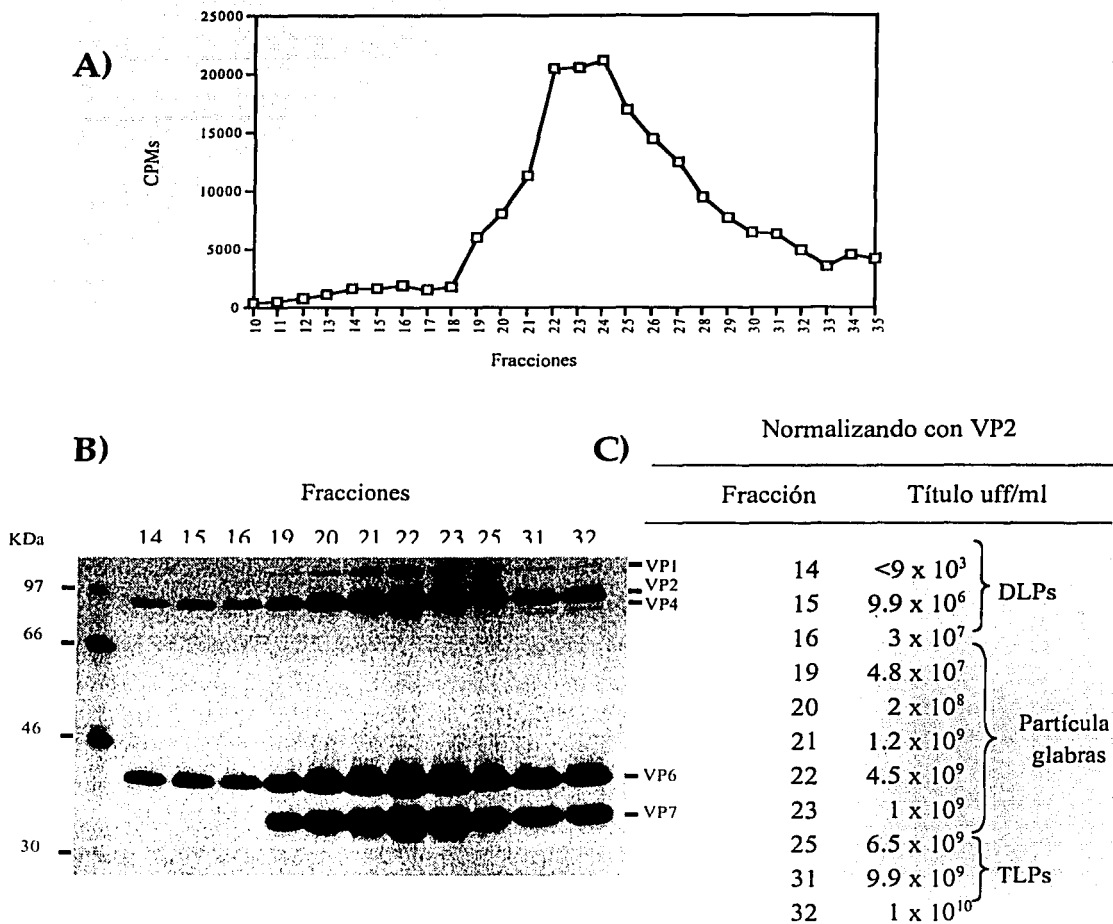


Figura 16. Fraccionamiento de un gradiente de CsCl de células infectadas en presencia del siRNAVP4. A) Detección de las partículas por la radiactividad presente en las fracciones. B) Autoradiografía del gel, correspondiente a la electroforesis de una alícuota de las proteínas en cada fracción. Dentro de lo posible se ajustó la concentración de proteínas en base a las cpms de A). C) Determinación del número de partículas infecciosas en cada fracción, ajustándolas en base a la cantidad de muestra usada y a la intensidad de la proteína VP2 cuantificada por densitometría.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Morfología de las partículas glabras

Por medio de microscopía electrónica se mostró que las partículas glabras tienen una superficie lisa semejante a las TLPs y diferente a la superficie rugosa de las DLPs (Figura 2C del artículo). Después de medir al menos 10 partículas, se pudo apreciar que el diámetro de las partículas glabras (~90nm) fue mayor al diámetro de las TLPs (~80nm).

Función de la proteína VP4 en la morfogénesis viral

La proteína VP4 no parece ser esencial para las últimas etapas de la morfogénesis viral

El hecho de que la síntesis de VP4 se abata de manera aparentemente total en presencia del siRNA^{VP4}, permitió plantearse el tratar de confirmar o descartar las funciones atribuidas a la proteína VP4 en la morfogénesis viral. Para evaluar esto, analizamos las etapas de la morfogénesis viral en las células lipofectadas con el siRNA^{VP4}, prestando atención especial a la ocurrencia de la gemación de las DLPs al interior del RE y a la pérdida de la capa de lípidos de las partículas intermediarias, también en el lumen del RE.

Para esta finalidad se analizaron por microscopía electrónica cortes de células MA104 infectadas con el rotavirus RRV y tratadas tanto con el siRNA^{VP4}, así como de células control lipofectadas con el siRNA^{LamA/C}. Debido a que la eficiencia de lipofección de los siRNAs es de aproximadamente 75%, se analizaron por lo menos 20 células diferentes, par tener un panorama representativo del efecto del siRNA^{VP4} (ausencia de VP4) en la morfogénesis viral. Previendo que la ausencia de la proteína VP4 provocaría que se acumularan partículas intermediarias impidiendo que se removiera la membrana lipídica, se incluyó otro control que consistió en el tratamiento de células MA104 con la droga tapsigargina durante la infección, que causa la acumulación de las partículas intermediarias con capa lipídica.

Las últimas etapas de la morfogénesis viral se pudieron apreciar claramente en las preparaciones tanto de las células tratadas con el siRNA^{VP4}, como de las células control lipofectadas con el siRNA^{LamA/C}. Se observó cómo las DLPs formadas en los viroplasmas geman hacia el lumen del RE, mientras se envuelven en la membrana del RE formando las partículas intermediarias y todavía mas importante, se

apreciaron viriones maduros que ya habían perdido la membrana y por lo tanto eran de menor tamaño. Estas observaciones fueron consistentes en todas las células tratadas con el siRNA^{VP4} que se analizaron (Figura 3 en el artículo). En cambio, las preparaciones de las células tratadas con tapsigargina mostraron invariablemente la acumulación de sólo partículas intermediarias con lípidos, sin la presencia partículas maduras en el lumen del RE (Figura 17A). Esta observación demuestra que dichas partículas intermediarias se hubiera podido apreciar claramente, si su acumulación resultara de la ausencia de VP4.

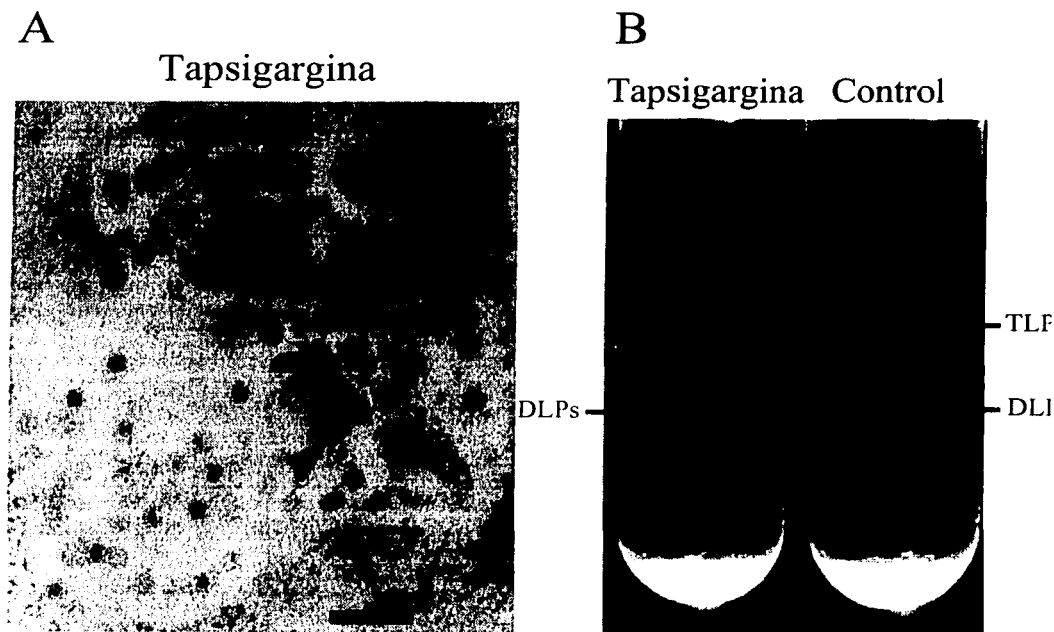


Figura 17. Efecto de la tapsigargina sobre la morfogénesis de los rotavirus. A) Microscopía electrónica de células MA104 infectadas en presencia de 1 μM de tapsigargina. Se observan únicamente partículas intermediarias con membrana lipídica. Aumento 20,000X, barra 400 nm. B) Gradiente de CsCl de partículas virales generadas en ausencia (control) o presencia de 1 μM de tapsigargina.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Estas observaciones indican que la proteína VP4 no se requiere ni para la gemación de las DLPs al RE, ni para la remoción de la membrana de lípidos para la maduración a la forma infecciosa. Por lo tanto, la presencia en el RE de partículas que habían perdido la membrana lipídica indicó que la maduración de las DLPs en partículas glabras ocurrió por la pérdida selectiva de los lípidos (en ausencia de la proteína VP4) y no por el proceso de purificación de las partículas por los gradientes de CsCl (27). En apoyo a esto, el gradiente de CsCl a partir de células tratadas con tapsigargina, sólo mostró la banda correspondiente a las DLPs (Figura 17B), indicando que en los intermediarios con lípidos no se ha ensamblado todavía la última capa protéica (VP7 y VP4) y que esto sucede durante la remoción de la capa lipídica, en el paso final de la morfogénesis.

Parte de los mensajeros de rotavirus son protegidos de la RNAi

La RNAi tiene como blanco directo aquel RNAm que comparte identidad en secuencia con el RNAdc (siRNA) que la activó. Intentando cuantificar y evidenciar la disminución del mensajero para VP4 en células lipofectadas con el siRNA^{VP4} e infectadas con el rotavirus, se extrajo RNA total de las células MA104, realizándose un ensayo de tipo Northern blot para detectar al segmento 4 y como control interno el segmento 6 (VP6) del rotavirus RRV. Sorprendente se encontró que aunque la síntesis de la proteína VP4 se abatió a niveles no detectables por inmunofluorescencia y disminuyó ≈75% por inmunoblot, los RNAs correspondientes al segmento 4 sólo se encontraron disminuidos entre un 18 y un 22%, determinado por los cocientes VP4/VP6, como se muestra en la Figura 18. Estos hallazgos parecen sugerir que una gran parte de los RNAs de los rotavirus se mantiene a salvo de la interferencia por medio de proteínas que los alejan de la vía de traducción hacia la vía de la morfogénesis viral.

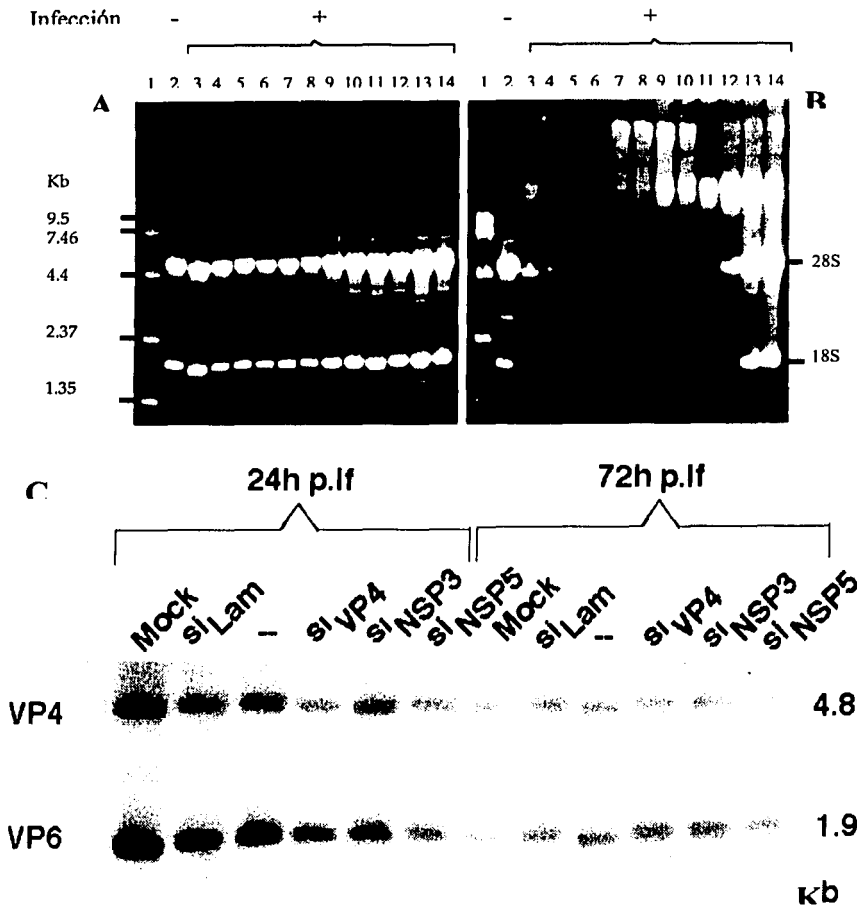


Figura 18. RNAs de rotavirus. A) RNA total de células MA104 12 h p.i con el rotavirus RRV a 24 ó 72h p.i.f. con tres siRNAs, separado por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, antes de la transferencia y B) después de la transferencia a la membrana de nylon. C) Northern blot detectando los RNAs de los segmentos 4 (VP4) y 6 (VP6) como control interno. Los carriles 3-14 en A) corresponden a los carriles 1-12 en (C), ya que se excluyeron de la membrana los dos primeros carriles. Se observa que los dos últimos carriles en B) no se transfirieron completamente, principalmente en el área que corresponde al RNAm de VP4 en C). En la parte inferior se muestran los cocientes de densitometría VP6/VP4, resaltando en negritas los que corresponden al tratamiento con el siRNA^{VP4}. El promedio de los cocientes VP6/VP4 de tratamiento con otros siRNAs tomados como controles, determinados por densitometría, sobre el del tratamiento con el siRNA^{VP4}, indica que para a las 24h existe un 76.4% de RNA del segmento 4 y para 72h es de 82%. Se excluyó el último valor de siRNA^{NSP5}, por lo expuesto arriba. La señal de los RNAs en B) se intensificó 2.6 veces más que la de A).

TESIS CON
.A DE ORIGEN

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

DISCUSION

La presente tesis doctoral tuvo como objetivo implementar una metodología que fuera altamente eficiente para inhibir la expresión de genes específicos de rotavirus. Mediante el sistema de RNAi, el objetivo se cumplió a cabalidad, usando como gen modelo a la proteína estructural VP4 del rotavirus RRV.

La inhibición de la expresión de los genes de rotavirus surgió como una necesidad y como una alternativa a la imposibilidad de alterar específicamente la expresión de un gen y recobrarlo en un virus infeccioso (45), lo que constituiría una estrategia de genética reversa, que en los rotavirus no ha sido imposible de llevar a cabo hasta la fecha. Las funciones de las proteínas virales se han estudiado hasta ahora principalmente a través de ensayos *in vitro*, por la selección y caracterización de variantes naturales y a través de la generación de virus rearreglantes (intercambio de segmentos de RNA -genes- entre dos cepas con fenotipos diferentes). En virus con genomas segmentados como los rotavirus el estudio de virus rearreglantes, permite identificar el segmento que cosegrega con un fenotipo determinado. Otro enfoque es la generación de mutantes termosensibles, en donde la atribución de un fenotipo a un segmento particular igualmente se establece mediante la generación de virus rearreglantes.

Tales enfoques, aunque sumamente útiles, han dado información limitada de la función de las proteínas virales. Debido a esto y en razón de que hasta ahora no existe un sistema de genética reversa en virus animales de RNAdc, surgió la necesidad de buscar métodos alternativos para la inhibición de la expresión de genes virales que permitieran estudiar en mayor detalle su función.

El marco teórico de este proyecto fué dado por el conocimiento de que la RNAi funcionaba en células de mamífero (15, 41, 42, 71, 100, 115) mostrando absoluta especificidad por el gen blanco. Además fue crucial el hallazgo de que los RNAs menores de 30 pb no activan las respuestas de "pánico" hacia RNAdc, ni alteran la homeostasis celular o la expresión de algún gen celular o viral (57, 61). La mayor dificultad prevista recayó en la tasa de transcripción de los rotavirus, que al ser muy alta, resulta en principio difícil de contarrestar (Figura 18A). Aparentemente las células de los mamíferos carecen de un mecanismo de amplificación de la RNAi,

como sucede en *C. elegans* y en las plantas; en cambio los siRNAs empleados en las células de mamíferos sólo sirven como guías para cortar un RNAm blanco a la vez (24, 56, 68, 73, 90, 132, 160, 190). Por estas razones, aunadas a la gran cantidad de mensajeros que sintetizan los rotavirus, y la aparente incapacidad de la RNAi de afectar al genoma viral de RNA_{dc} que se encuentra inaccesible, hacían al objetivo de esta propuesta, una empresa difícil de cumplir.

Sin embargo la naturaleza segmentada y la inaccesibilidad del genoma de los rotavirus a la maquinaria inhibitoria de la RNAi, también puede visualizarse como una ventaja para el estudio de los genes de esta clase de virus, en el sentido de que como sólo se puede interferir la traducción de sus genes, se puede inhibir un gen de manera aislada, degradando su RNAm. Esto se asemeja a lo que ocurre con los genes celulares, donde la maquinaria de degradación de la RNAi no actúa en el núcleo y sólo afecta los RNAs en el citoplasma (196). Los genes de los virus de RNA con genomas lineales grandes son más complicados de estudiar mediante la RNAi, ya que la afectación de un RNAm, también afecta al RNA genómico, lo que en este caso es un inconveniente. Para los virus de esta última clase, la RNAi se ha reportado para propósitos antivirales, ya que la degradación del genoma evita la transcripción de sus genes y por ende la traducción, constituyendo un arma muy poderosa de control (1, 15, 32, 59, 74, 79, 85, 97, 131, 153). De hecho el sistema celular de RNAi impediría la replicación del virus en la misma célula infectada y por ende su diseminación a otras células. De tal manera la RNAi pudiera tener una función importante en la lucha contra las infecciones virales en organismos eucariontes, por ejemplo, algunos virus de plantas codifican para proteínas que evaden la RNAi bloqueando el silenciamiento a nivel celular y sistémico (4, 12, 18, 23, 87, 179, 180, 182). Esto mismo se ha observado en virus de insectos, como el virus de la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), que también produce una proteína que es esencial para la replicación del virus, que bloquea la respuesta de RNAi en células en cultivo (101).

En este estudio primeramente se determinó que la maquinaria de interferencia descrita para células de mamífero también fuera operativa en la línea celular MA104, derivada de epitelio de riñón del mono *Rhesus*, en la cual se propagan los rotavirus y donde se ha establecido su modelo de replicación. La inhibición de la síntesis de las laminas A/C por el siRNA^{LamA/C} probó de manera clara la existencia de la maquinaria de RNAi en este linaje celular (Figura 9).

Cabe resaltar, sin embargo, que los rotavirus naturalmente tienen un tropismo hacia las células epiteliales del intestino delgado, las cuales son altamente polarizadas, por lo que el estudio y uso de la interferencia en la línea celular Caco-2 pudiera dar información más apegada a lo que sucede en una infección natural. La futura validación de los resultados aquí presentados en esta línea celular Caco-2, serán importantes para aclarar el supuesto papel central de la proteína VP4 en la morfogénesis de los rotavirus en células diferenciadas, que la califican como indispensable para ensamblar las partículas virales y permitir la liberación apical de los viriones mediante vesículas en ausencia de lisis celular (80, 159).

La utilidad de la RNAi como una alternativa viable para el estudio de los genes de rotavirus, mediante la inhibición de la síntesis de la proteína respectiva empleando siRNAs, se puso de manifiesto cuando se eligió silenciar a la proteína VP4. El fenotipo por ausencia de dicha proteína, que se caracterizó sistemáticamente en células transfectadas con el siRNA^{VP4} e infectadas con rotavirus, fue notorio y reproducible; la progenie de rotavirus, al igual que la síntesis de la proteína VP4, se redujeron aproximadamente a 25%. El ≈75% de las células infectadas no tuvieron VP4 detectable por inmunofluorescencia y se ensamblaron partículas con triple capa que carecían de VP4 (glabras).

Considerando que la eficiencia de transfección estimada para MA104 fue alrededor de un 75%, los hallazgos de ≈25% de progenie, ≈25% de proteína, y ≈75% de células que no expresaron VP4, sugieren que el ≈25% de progenie residual y de proteína VP4 no inhibida, proviene de las células no transfectadas.

Esta tecnología además mostró ser altamente específica por su blanco; así, no se alteraron los niveles de otras proteínas virales, como NSP2, NSP3 y NSP5 en la misma cepa de rotavirus RRV, ni tampoco la proteína VP4 de cepas de diferentes rotavirus como YM y RF. Los rendimientos virales de las cepas YM y RF en presencia del siRNA^{VP4} tampoco se alteraron.

La reducción del rendimiento de la progenie viral en ≈75% sugirió que la ausencia de VP4 alteró drásticamente la producción de partículas virales infecciosas en algún punto del ciclo de replicación en las células interferidas. Esta alteración pudo haberse dado a nivel de la gemación o de la maduración final de las partículas virales, etapas en las que se ha sugerido que VP4 pudiera participar.

El involucramiento de VP4 en la morfogénesis se basa en las siguientes características:

1. VP4 se ha aislado formando complejos heterotriméricos con VP7 y con NSP4, habiéndosele asignado a esta última proteína la función de receptor para las DLPs en la membrana del RE, durante el proceso de gemación (9, 110).
2. Las partículas virales tienen una actividad lipofílica atribuida a VP4 (40, 128, 157).
3. La proteína VP4 posee un dominio de permeabilización de membranas entre los aminoácidos 384-401, similar al dominio de fusión de membranas de los alfavirus (106, 111).

Estas características sugerían que VP4 es una proteína importante, no sólo para la entrada del virus a la célula huésped, sino también probablemente para la maduración viral durante la gemación hacia el retículo endoplásmico y en la remoción de lípidos de las partículas intermediarias. Procesos en los que las características de VP4 facilitarían la transferencia de partículas a través de las membranas (175).

Dentro de los aspectos por dilucidar en la morfogénesis de los rotavirus están: el posible funcionamiento del complejo heterotrimérico como receptor de las DLPs, el mecanismo de exclusión de la membrana del intermediario y el proceso de ensamblaje de la tercera capa protéica.

Las contribuciones de este trabajo al conocimiento de la morfogénesis de los rotavirus, se pueden resumir de la siguiente manera:

Primera

Se pudo deducir que en la función del heterotrímero NSP4-VP4-VP7 como receptor para las DLPs en la membrana del RE, la actividad de VP4 es dispensable, como queda demostrado por la traslocación de las DLPs al RE en la ausencia de la proteína VP4.

Segunda

El ensamble de la tercera capa no requiere de VP4 como se demostró por la obtención de partículas TLPs glabras, conteniendo sólo la proteína VP7 como tercera capa.

Es interesante notar que el proceso de ensamblaje de VP7 en la ausencia de VP4 parece haber sido facilitado, como se deduce de la intensidad de la banda extra generada en los gradientes de CsCl, que resultó entre ~4-6 veces mayor a las otras dos bandas (DLPs y TLPs) como se muestra en la **Figura 14**. Esta observación coloca a VP4 como una proteína reguladora que controla el ensamble final de los viriones infecciosos, revelando la capacidad intrínseca de VP7 para autoensamblarse sobre las DLPs, por un mecanismo que no requiere de VP4 como se había propuesto (58).

Tercera

La remoción de la envoltura lipídica de los intermediarios no depende de la participación de VP4. Entonces la actividad requerida para el proceso puede ser aportada por NSP4 (correctamente glicosilada) o por algún evento asociado al ensamble de VP7 en la tercera capa.

La eliminación de VP4 por la RNAi fue muy útil para su caracterización funcional, puesto que permitió descartar las funciones atribuidas a esta proteína, sobre la maduración de los rotavirus durante la gemación al lumen del RE y la remoción de la membrana lipídica. No se descarta que el dominio lipofílico de VP4, no obstante su aparente pasividad en la morfogénesis viral, contribuya activamente en la internalización del virus a su célula huésped.

Las partículas glabras carentes de VP4 no son infecciosas y la infectividad residual encontrada parece ser producto de la contaminación con TLPs. Este hallazgo apoya observaciones previas que identifican a VP4 en los eventos tempranos de la infección viral como son la unión a los receptores celulares y la penetración (6, 105, 156, 194). Sin embargo la participación de VP4 sí es indispensable para la infectividad de las partículas, puesto que si bien su ausencia origina un mayor número de partículas, estas no son infecciosas.

En cuanto al mayor tamaño de las partículas glabras (~90nm) con respecto a las TLPs (~80nm), este puede ser debido a que la capa de VP7 adopta una conformación más laxa en ausencia de VP4, que en este sentido dirigiría una mayor compactación de la capa externa. VP4 parece interactuar con dos moléculas de VP7 en la capa externa y con seis moléculas de VP6 sobre la segunda capa protéica, además parecen existir interacciones más específicas entre el homodímero de VP4 y dos de las seis moléculas de VP6. Las interacciones VP4-VP7 y VP4-VP6 implican que VP4 puede participar manteniendo el registro geométrico preciso entre la capa intermedia y la externa (45). La potencial diferencia en la interacción de moléculas de VP7 y VP6, no se puede discernir en los ensayos de microscopía electrónica que se realizaron.

Finalmente los resultados indican que la desviación de RNAs de rotavirus hacia la ruta de morfogénesis, tal vez por proteínas virales y/o celulares, protegió de la degradación a aproximadamente el 80% de los RNAs de VP4 hacia el final de un ciclo viral de 12h. Esta podría ser una de las estrategias virales para impedir que sus RNAs se reconozcan y se degraden por la RNAi u otros mecanismos celulares. Una observación similar se ha hecho con el virus sincitial respiratorio (RSV), donde transfectando siRNAs contra el virus se logró la degradación del RNAm, pero no del RNA genómico (15). También puede ser el reflejo de la mayor proporción de RNAm genómico/RNAm traducándose, al finalizar un ciclo de replicación, lo cual podría variar durante el ciclo replicativo.

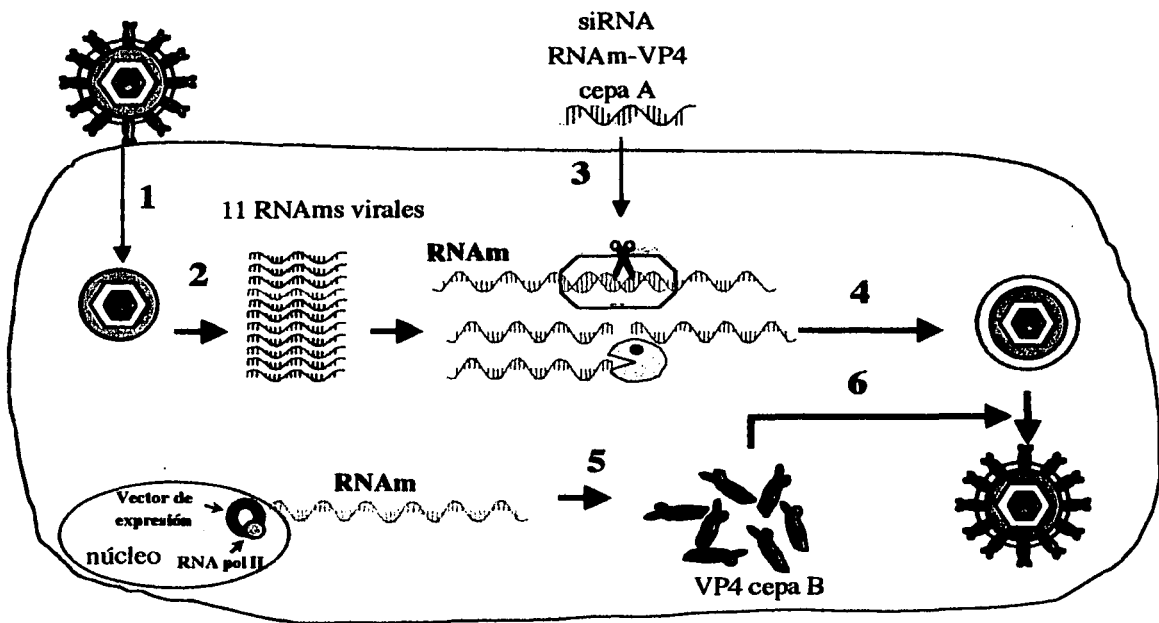


Figura 19. La RNAi en el estudio de la función de los genes de rotavirus. La cepa A de rotavirus compuesta por tres capas de proteínas (espículas en rojo) ingresa a una célula, proceso durante el cual pierde la capa más externa (paso 1). En el citoplasma celular el virus con doble capa protéica transcribe sus genes a RNAs, los cuales codifican por las proteínas virales, incluida VP4 que es la proteína que forma las espículas del virus (paso 2). La lipofección de la célula con siRNAs que degradan específicamente al RNA de VP4 (espículas en rojo) e evita la síntesis de esta proteína de manera selectiva (paso 3). Se ensamblan partículas de rotavirus con tres capas, pero sin espículas (paso 4). La introducción a la célula de un vector de expresión que dirige la síntesis de VP4 de una cepa diferente a la cepa A (cepa B, en verde) (paso 5), la cual no es afectada por la RNAi, propiciará que nuevamente se ensamblen virus completos (paso 6), en un proceso denominado "rescate fenotípico". Esto último permitirá realizar mutaciones en la proteína VP4 y observar el efecto sobre el comportamiento de esos nuevos virus.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CONCLUSIONES

1. Se implementó una metodología eficiente para inhibir la traducción de genes específicos de rotavirus, basada en el mecanismo de RNAi, usando RNAs interferentes pequeños (siRNAs).
2. La aplicación de la metodología permitió inhibir eficientemente la síntesis de la proteína VP4 de rotavirus, permitiendo la caracterización del fenotipo en su ausencia.
3. En relación a la morfogénesis viral, la proteína VP4:
 - A) No parece participar ni en la gemación de las DLPs al lumen del RE, ni en la remoción de los lípidos de las partículas intermediarias.
 - B) Aparentemente tiene un papel regulatorio en el ensamble de la tercera capa y en la compactación del virión.

PERSPECTIVAS

1) Realizar la complementación fenotípica de las partículas glabras del rotavirus RRV con una VP4 heteróloga.

Se pueden expresar las proteínas VP4 de los rotavirus porcino YM o bovino RF, en células MA104 exhibiendo la RNAi para la proteína VP4 de RRV (por la presencia del siRNA^{VP4}), esperando que se rescaten partículas completas e infecciosas que hayan incorporado la VP4 no interferible (Figura 19).

En este sentido, la generación de VLPs en células de insecto con la combinación VP2/VP4/VP6/VP7 (35); la reconstitución *in vitro* de TLPs infecciosas a partir de núcleos virales o de DLPs, usando proteínas de la capa externa, incluso provenientes de diferentes cepas (28, 29), y la generación exitosa de virus mono-rearreglantes (VP4 de la cepaYM sobre un fondo genético de RRV), representan hechos que hacen viable la propuesta.

2) Realizar mutaciones dirigidas en el gen que codifica para la proteína VP4

Después de confirmar el recate fenotípico de las partículas glabras, se podrá alterar por mutagénesis dirigida cualquier dominio y motivo funcional sugerido para VP4, estableciendo categóricamente las contribuciones de tales secuencias en la infectividad y en el ciclo replicativo de los rotavirus. Esto constituiría un sistema cercano a lo que sería la genética reversa en rotavirus y aplicable a los miembros de la familia *Reoviridae*.

3) Establecer una línea celular que exprese constantemente shRNAs con la secuencia del siRNA^{VP4}.

Indudablemente el éxito obtenido con la transfección de los siRNAs puede potenciarse, si en las células se aumenta el nivel de siRNAs por medio de una expresión constitutiva de shRNAs, incrementando la concentración de complejos RISC activados y alcanzando la mayor degradación posible del RNAm blanco. Esto probablemente abatirá completamente la traducción y tal vez hasta la morfogénesis de las partículas glabras, por la falta del segmento 4. Si se llegara a ese punto, no sólo se podría realizar una complementación fenotípica con proteínas, sino con RNAm que al incorporarse en la progenie viral haría posible una genética reversa verdadera. Otra ventaja del desarrollo de las líneas estables es que permitiría la recuperación de clonas fenotípicas, por ejemplo, para el caso del shRNA^{VP4}, sólo existirían partículas glabras sin reminiscencias de la proteína VP4. La complementación de estas clonas fenotípicas con una VP4 ortóloga, produciría TLPs constituídas exclusivamente de partículas rescatadas.

4) Aplicar la RNAi para el estudiar la función de otros genes de rotavirus

Sería interesante interferir la síntesis de la proteína NSP4 para continuar el estudio de la morfogénesis de los rotavirus, ya que esto permitiría disectar muy claramente la participación del heterotrímero NSP4-VP4-VP7 como receptor de las DLPs, su papel en el ensamble preciso de la tercera capa proteica y su contribución en la remoción de la capa de lípidos del intermediario transitorio. Igualmente la interferencia de VP7 ayudaría a evaluar su papel en estos procesos. Simultáneamente se esclarecería la posible existencia de un ensamble completo de las DLPs previo a la traslocación al RE.

5) Determinar la estructura de las partículas glabras por criomicroscopía electrónica

Esto permitiría establecer con mayor precisión los nuevos contactos establecidos entre VP6-VP7 y entre las diferentes moléculas de VP7, que provocaron que las partículas glabras sean más grandes que las TLPs.

BIBLIOGRAFIA

1. **Adelman Z.N., Sánchez-Vargas I., Travanty E.A., Carlson J.O., Beaty B.J., Blair C.D., Olson K.E.** 2002. RNA silencing of Dengue Virus Type 2 replication in transformed C6/36 mosquito cells transcribing an inverted-repeat RNA derived from the virus genome. *Journal of Virology*. **74**:12925-12933.
2. **Ahlquist P.** 2002. RNA-dependent RNA polymerases, viruses, and RNA silencing. *Science*. **296**:1270-1273.
3. **Ahmadian S., Shahrabadi M. S.** 1999. Morphological study of the role of calcium in the assembly of the rotavirus outer capsid protein VP7. *Biotechniques Histochemistry*. **74**:266-273.
4. **Anandalakshmi R., Pruss G. J., Ge X., Marathe R., Mallory A.C., Smith T.H., Vance V.B.** 1998. A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. **95**:13079-13084.
5. **Anthony I.D., Bullivant S., Dayal S., Bellamy A.R., Berriman J.A.** 1991. Rotavirus spike structure and polypeptide composition. *Journal of Virology*. **65**:4334-4340.
6. **Arias C.F, Isa P., Guerrero C.A., Mendez E., Zarate S., Lopez T., Espinosa R., Romero P., Lopez S.** 2002. Molecular biology of the rotavirus cell entry. *Archives of Medical Research*. **33**:356-361.
7. **Arias C.F., Romero P., Alvarez V., Lopez S.** 1996. Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity. *Journal of Virology*. **70**:5832-5839.
8. **Ashrafi K., Chang F. Y., Watts J.L., Fraser A.G., Kamath R.S., Ahringer J., Ruvkun G.** 2003. Genome-wide RNAi analysis of *Caenorhabditis elegans* fat regulatory genes. *Nature*. **421**:268-272.
9. **Au K-S, Chan W. K., Burns J.W., Estes M.K.** 1989. Receptor activity of rotavirus nonstructural glycoprotein NS28. *Journal of Virology*. **63**:4553-4562.
10. **Au K-S, Mattion N. M., Estes M.K.** 1993. A subviral particle binding domain on the rotavirus nonstructural glycoprotein NS28. *Virology*. **194**:665-673.

11. **Baulcombe D.C.** 1999. Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Current Opinion in Plant Biology*. 2:109-113.
12. **Beclin C., Berthome R., Palauqui J., Tepfer M., Vaucheret H.** 1998. Infection of tobacco or Arabidopsis plants by CMV counteracts systemic post-transcriptional silencing of noviral (trans)genes. *Virology*. 252:313-317.
13. **Bernstein E, Denli A., Hannon GJ** 2001. The rest is silence. *RNA*. 7:1509-1521.
14. **Bernstein E., Caudy A. A., Hammond S.M., Hannon G.J.** 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*. 409:363-366.
15. **Bitko V., Barik S.** 2001. Phenotypic silencing of cytoplasmic genes using sequence-specific double-stranded short interfering RNA and its application in the reverse genetics of wild type negative-strand RNA viruses. *BMC Microbiology*. 1:34-44.
16. **Borkhardt A.** 2002. Blocking oncogenes in malignant cells by RNA interference- new hope for a highly specific cancer treatment. *Cancer Cell*. 3:167-168.
17. **Bridger J.C., Woode G. N.** 1976. Characterization of two particle types of calf rotavirus. *Journal of General Virology*. 31:245-250.
18. **Brigneti G., Voinnet O., LI W-X, Ji L-H, Ding S-W, Baulcombe D.C.** 1998. Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO Journal*. 17:6739-6746.
19. **Brummelkamp T.R., Bernards R., Agami R.** 2002. Stable suppression of tumorigenicity by virus mediated RNA interference. *Cancer Cell*. 3:243-247.
20. **Brummelkamp T.R., Bernards R., Agami R.** 2002. A System for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*. 21:550-553.
21. **Burnett W.V.** 1997. Northern blotting of RNA denatured in glyoxal without buffer recirculation. *BioTechniques*. 22:668-671.
22. **Caplen N.J.** 2001. A new approach to the inhibition of gene expression. *Trends in Biotechnology*. 20:49-51.
23. **Carrington JC, Kasschau K., Johansen LK** 2001. Activation and suppression of RNA silencing by plant viruses. *Virology*. 281:1-5.
24. **Celotto A.M., Graveley B. R.** 2002. Exon-specific RNAi: a tool for dissecting the functional relevance of alternative splicing. *RNA*. 8:718-724.

25. **Chan W.K., Au K. S., Estes M.K.** 1988. Topography of the simian rotavirus nonstructural glycoprotein (NS28) in the endoplasmic reticulum membrane. *Virology*. **164**:435-442.
26. **Chen D., Gombold J. L., Ramig R.F.** 1990. Intracellular RNA synthesis directed by temperature-sensitive mutants of simian rotavirus SA11. *Virology*. **178**:143-151.
27. **Chen D., Ramig R. F.** 1992. Determinants of rotavirus stability and density during CsCl purification. *Virology*. **186**:228-237.
28. **Chen D., Ramig R. F.** 1993. Rescue of infectivity by *in vitro* transcapsidation of rotavirus single-shelled particles. *Virology*. **192**:422-429.
29. **Chen D., Ramig R. F.** 1993. Rescue of infectivity by sequential *in vitro* transcapsidation of rotavirus core particles with inner capsid and outer capsid proteins. *Virology*. **194**:743-751.
30. **Chen D., Zeng C. Q., Wentz M.J., Gorziglia M., Estes M.K., Ramig R.F.** 1994. Template-dependent, *in vitro* replication of rotavirus RNA. *Journal of Virology*. **68**:7030-7039.
31. **Clarke P.A., Mathews M. B.** 1995. Interaction between the double-stranded RNA binding motif and RNA: definition of the binding site for the interferon-induced protein kinase DAI (PKR) on adenovirus VA RNA. *RNA*. **1**:7-20.
32. **Coburn G.A., Cullen B. R.** 2002. Potent and specific inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by RNA interference. *Journal of Virology*. **76**:9225-9231.
33. **Cogoni C., Ireland J. T., Schumache M., Schmidhauser T., Selker E.U., Macino G.** 1996. Transgene silencing of the *al-1* gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation. *EMBO Journal*. **15**:3153-3163.
34. **Coulson B.S., Londrigan S. L., Lee D.J.** 1997. Rotavirus contains integrin ligand sequences and a didintegrin-like domain that are implicated in virus entry into the cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. **94**:5389-5394.
35. **Crawford S.E., Labbe M., Cohen J., Burroughs M.H., Zhou Y.J., Estes M.K.** 1994. Characterization of virus-like particles produced by the expression of rotavirus capsid proteins in insect cells. *Journal of Virology*. **68**:5945-5922.

36. **Dalmay T., Hamilton A., Rudd S., Angell S., Baulcombe D.C.** 2000. An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for post-transcriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell*. 101:543-553.
37. **Dalmay T., Horsefield R., Harting Braunstein T., Baulcombe D.C.** 2001. SDE3 encodes an RNA helicase required for post-transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*. *EMBO Journal*. 20:2069-2077.
38. **Devroe E., Silver P.** 2002. Retrovirus-delivered siRNA. *BMC Biotechnology*. 2:15.
39. **Djikeng A., Shi H., Tschudi C.** 2001. RNA interference in *Trypanosoma brucei*: cloning of small interfering RNAs provides evidence for retroposon-derived 24-26-nucleotide RNAs. *RNA*. 7:1522-1530.
40. **Dowling W., Desinova E., LaMonica R., Mackow E.R.** 2000. Selective membrane permeabilization by the rotavirus VP5 protein is abrogated by mutations in an internal hydrophobic domain. *Journal of Virology*. 74:6368-6376.
41. **Elbashir S.M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K., Tuschl T.** 2001. Duplex of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. 411:494-498.
42. **Elbashir S.M., Harborth J., Weber K., Tuschl T.** 2002. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods*. 26:199-213.
43. **Elbashir S.M., Martínez A., Patkaniowska A., Lendeckel W., Tuschl T.** 2001. Functional anatomy of siRNA for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO Journal*. 20:6877-6888.
44. **Espejo R.T., López S., Arias C.** 1981. Structural polypeptides of simian rotavirus SA11 and the effect of trypsin. *Journal of Virology*. 37:156-160.
45. **Estes M.K.** 1996. Rotavirus and their replication. *En Fields B. N. et al (eds), Virology*. Raven Press, New York. Vol 2, pp. 1625-1655.
46. **Estes M.K., Cohen J.** 1989. Rotavirus gene structure and function. *Microbiology Reviews*. 53:410-449.
47. **Estes M.K., Graham D. Y., Smith E.M., Gerba C.P.** 1979. Rotavirus stability and inactivation. *Journal of General Virology*. 43:403-409.

48. **Fabbretti E., Afrikanova I., Vascotto F., Burrone O.R.** 1999. Two non-structural rotavirus proteins, NSP2 and NSP5, form viroplasm-like structures *in vivo*. *Journal of General Virology*. **80**:333-339.
49. **Fabian E., Jones F. E., Baulcombe D.C.** 2002. Spreading of RNA targeting and DNA methylation in RNA silencing requires transcription of the target gene and a putative RNA dependent RNA polymerase. *Plant Cell*. **14**:857-867.
50. **Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C.** 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. **391**:806-811.
51. **Flewett T.H., Bryden A. S., Davies H., Woode G.N., Bridger J.C., Derrick J.M.** 1974. Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. *Lancet*. **2**:61-63.
52. **Flores J., Midthun K., Hoshino Y., Green K., Gorziglia M., Kapikian A.Z., Chanock R.M.** 1986. Conservation of the fourth gene among rotaviruses recovered from asymptomatic newborn infants and its possible role in attenuation. *Journal of Virology*. **60**:972-979.
53. **Fuentes-Pananá E.M., López S., Gorziglia M., Arias C.F.** 1995. Mapping the hemagglutination domain of rotaviruses. *Journal of Virology*. **69**:2629-2632.
54. **Fuhrmann M., Stahlberg A., Govorunova E., Rank S., Hegemann P.** 2001. The abundant retinal protein of the *Chlamydomonas* eye is not the photoreceptor for phototaxis and photophobic responses. *Journal of Cell Science*. **114**:3857-3863.
55. **Gallegos C.O., Patton J. T.** 1989. Characterization of rotavirus replication intermediates: a model for the assembly of single-shelled particles. *Virology*. **172**:616-627.
56. **Garrus J.E., vonSchwedler U. K., Pornillos O.W., Morham S.G., Zavitz K.H., Wang H.E., Wettstein D.A., Stray K.M., Cote M., Rich R.L., Myszka O.G., Sundquist W.I.** 2001. Tsg 101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell*. **107**:55-65.
57. **Gil J., Esteban M.** 2000. Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): mechanism of action. *Apoptosis*. **5**:107-114.

58. **Gilbert J.M., Feng N., Patton J.T., Greenberg H.B.** 2001. Rotavirus assembly-interaction of surface protein VP7 with middle layer protein VP6. *Archives of Virology*. **146**:1155-1171.
59. **Gitlin L., Karelsky S., Andino R.** 2002. Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells. *Nature*. **418**:430-434.
60. **Gombold J.L., Ramig R. F.** 1987. Assignment of simian rotavirus SA11 temperatursa sensitive mutant groups A, C, F, and G to genome segments. *Virology*. **161**:463-473.
61. **Goodbourn S., Didcock L., Randall R.E.** 2000. Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral responses and virus countermeasures. *Journal of General Virology*. **81**:2341-2364.
62. **Gorziglia M., Hoshino Y., Buckler-White A., Blumentals I., Glass R., Flores J., Kapikian A.Z., Chanock R.M.** 1986. Conservation of the amino acid sequence of VP8 and cleavage region of 84-KDa outer capsid protein among rotaviruses recovered from asymptomatic neonatal infection. *Proceedings of the National Academy of the Sciences USA*. **83**:7039-7043.
63. **Grishok A., Pasquinelli A. E., Conte D., Li N., Parrish S., Ha I., Baillie D.L., Fire A., Ruvkun G., Mello C.C.** 2001. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell*. **106**:23-34.
64. **Guerrero C.A., Méndez E., Zárate S., Isa P., López S., Arias C.F.** 2000. Biochemical characterization of rotavirus receptors in MA104 cells. *Journal of Virology*. **74**:9362-9371.
65. **Ha I., Wightman B., Ruvkun G.** 1996. A bulged lin-4/lin-14 RNA duplex is sufficient for *Caenorhabditis elegans* lin-14 temporal gradient formation. *Genes and Development*. **10**:3041-3050.
66. **Hamilton A.J., Baulcombe D. C.** 1999. A species of small antisense RNA in postranscriptional gene silencing in plants. *Science*. **286**:950-952.
67. **Hammond S.M., Bernstein E., Beach D., Hannon G.J.** 2000. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*. **404**:293-296.

68. **Hammond S.M., Bernstein S., Caudy A.A., Kobayashi R., Hannon G.J.** 2001. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analysis of RNAi. *Science*. **293**:1146-1150.
69. **Han Y., Grierson D.** 2002. Relationship between small antisense RNAs and aberrant RNAs associated with sense transgene mediated gene silencing in tomato. *Plant Journal*. **29**:509-519.
70. **Hannon G.J.** 2002. RNA interference. *Nature*. **418**:244-251.
71. **Harborth J., Elbashir S. M., Bechert K., Tuschl T., Weber K.** 2001. Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *Journal of Cell Science*. **114**:4557-4565.
72. **Hewish M.J., Takada Y., Coulson B.S.** 2000. Integrins alpha2beta1 and alpha4beta1 can mediate SA11 rotavirus attachment and entry into cells. *Journal of Virology*. **74**:228-236.
73. **Holen T., Amarzguioui M., Wiiger M.T., Babaie E., Prydz H.** 2002. Positional effects of short interfering RNA targeting the human coagulation trigger tissue factor. *Nucleic Acid Research*. **30**:1757-1766.
74. **Hu W., Myers C., Kilzer J., Pfaff S., Bushman F.** 2002. Inhibition of retroviral pathogenesis by RNA interference. *Current Biology*. **12**:1301.
75. **Hua J., Patton J. T.** 1994. The carboxyl-half of the rotavirus nonstructural protein NS53 (NSP1) is not required for virus replication. *Virology*. **198**:567-576.
76. **Hutvagner G., Zamore P.** 2002. A micro-RNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*. **297**:2056-2060.
77. **Hutvagner G., McLachlan J., Pasquinelli A.E., Balint E., Tuschl T., Zamore P.D.** 2001. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*. **293**:834-838.
78. **Isa P., López S., Segovia L., Arias C.F.** 1997. Functional and structural analysis of the sialic acid-binding domain of rotavirus. *Journal of Virology*. **71**:6749-6756.
79. **Jacque J-M, Triques K., Stevenson M.** 2002. Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature*. **418**:435-438.

80. **Jourdan N., Maurice M., Delautier D., Quero A.M., Servin A.L., Trugnan G.** 1997. Rotavirus is released from the apical surface of cultured human intestinal cells through nonconventional vesicular transport that bypasses the Golgi apparatus. *Journal of Virology*. **71**:8268-8278.
81. **Kabcenell K., Atkinson P. H.** 1985. Processing of through endoplasmic reticulum membrane glycoproteins of rotavirus SA11. *Journal of Cellular Biology*. **101**:1270-1280.
82. **Kabcenell A.K., Pouruchynsky M. S., Bellamy A.R., Greenberg H.B., Atkinson P.H.** 1988. Two forms of VP7 are involved in assembly of SA11 rotavirus in endoplasmic reticulum. *Journal of Virology*. **62**:2929-2941.
83. **Kalika A.R., Flores J., Greenberg H.B.** 1983. Identification of the gene that codes for the haemagglutinin and protease enhanced plaque formation. *Virology*. **125**:194-205.
84. **Kamath R.S., Fraser A. G., Dong Y., Poulin G., Durbin R., Gotta M., Kanapin A., Le Bot N., Moreno S., Sohrmann M., Welchman D.P., Zipperlen P., Ahringer J.** 2003. Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature*. **461**:231-237.
85. **Kapadia S.B., Brideau-Andersen A., Chisari F.V.** 2003. Interference of Hepatitis C virus RNA replication by short interfering RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. **100**:2014-2018.
86. **Kapikian A.Z., Chanock R. M.** 2001. Rotaviruses. *In* Knipe D. M. y Howley PM (eds.), *Fields Virology*, Lippincott-Raven, Philadelphia, PA. vol. 2. pp. 1787-1833
87. **Kasschau K.D., Carrington J. C.** 1998. A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of post-transcriptional gene silencing. *Cell*. **95**:461-470.
88. **Ketting R.F., Fische S. E., Bernstein E., Sijen T., Hannon G.J., Plasterk R.H.** 2001. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNAs involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes and Development*. **15**:2654-2659.
89. **Ketting R.F., Haverkamp T. H., van Luenen H.G., Plasterk R.H.** 1999. Mut-7 of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference is a homolog of Werner syndrome helicase and RNaseD. *Cell*. **99**:133-141.

90. **Kieselow M., Kleiner S., Nagasawa M., Faisal A., Nagamine Y.** 2002. Isoform-specific knockdown and expression of adaptor protein ShcA using small interfering RNA. *Biochemical Journal*. **363**:1-5.
91. **Kim Y., Chang K.-O., Kim W.-Y., Saif L.J.** 2002. Production of hybrid double or triple-layered virus-like particles of group A and C rotavirus using a baculovirus expression system. *Virology*. **302**:1-8.
92. **Knight S.W., Bass B. L. A.** 2001. A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. **293**:2269-2271.
93. **Lagos-Quintana M., Rauhut R., Lendeckel W., Tusch L.** 2001. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*. **294**:853-858.
94. **Lai E.C.** 2002. Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nature Genetics*. **30**:363-364.
95. **LaMonica R., Kocer S. S., Nazarova J., Dowling W., Geimonen E., Shaw R.D., Mackow E.R.** 2001. VP4 differentially regulates TRAF2 signaling, disengaging JNK activation while directing NF- κ B to effect rotavirus-specific cellular responses. *Journal of Biological Chemistry*. **276**:19889-19896.
96. **Lau N.C., Lim L. P., Weinstein E.G., Bartel D.P.** 2001. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. **294**:858-862.
97. **Lee N.S., Dohjima T., Bauer G., Li H., Li M.-J., Eshani A., Salvaterra P., Rossi J.** 2002. Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 *rev* transcription in human cells. *Nature Biotechnology*. **20**:500-505.
98. **Lee R.C., Ambros V.** 2001. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. **294**:862-864.
99. **Lee R.C., Feinbaum R. L., Ambros V.** 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. **75**:843-854.
100. **Leirdal M., Sioud M.** 2002. Gene silencing in mammalian cells by performed small RNA duplex. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **295**:744-748.
101. **Li H., Li W. X., Ding S.W.** 2002. Induction and suppression of RNA silencing by an animal virus. *Science*. **296**:1319-1321.

102. **Lindbo J.A., Dougherty W. G.** 1992. Untranslatable transcripts of the tobacco etch virus coat protein gene sequence can interfere with tobacco etch virus replication in transgenic plants and protoplasts. *Virology*. **2**:725-733.
103. **Lipardi C., Wei Q., Paterson B.M.** 2001. RNAi as random degradative PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNA. *Cell*. **107**:297-307.
104. **Londrigan S.L., Hewish M. J., Thomson M.J., Sanders G.M., Mustafa H., Coulson B.S.** 2000. Growth of rotaviruses in continuous human and monkey cell lines that vary in their expression of integrins. *Journal of General Virology*. **81**:2203-2213.
105. **Ludert J.E., Feng N., Yu J.H., Broome R.L., Hoshino Y., Greenberg H.B.** 1996. Genetic mapping indicates that VP4 is the rotavirus cell attachment protein *in vitro* and *in vivo*. *Journal of virology*. **70**:487-493.
106. **Mackow E.R., Shaw R. D., Matsui S.M., Vo P.T., Dang M.N., Greenberg H.B.** 1988. The rhesus rotavirus gene encoding protein VP3: location of aminoacids involved in homologous and heterologous rotavirus neutralization and identification as a putative fusion region. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. **85**:645-649.
107. **Mansell E.A., Patton J. T.** 1990. Rotavirus RNA replication: VP2, but not VP6, is necessary for viral replicase activity. *Journal of Virology*. **64**:4988-4996.
108. **Mansell E.A., Ramig R. F., Patton J.T.** 1994. Temperature-sensitive lesions in the capsid proteins of the rotavirus mutants tsF and tsG that affect virion assembly. *Virology*. **204**:69-81.
109. **Mass D.R., Atkinson P. H.** 1994. Retention by the endoplasmic reticulum of rotavirus VP7 is controlled by three adjacent amino acid residues. *Journal of Virology*. **68**:366-378.
110. **Mass D.R., Atkinson P. H.** 1990. Rotavirus proteins VP7, NS28, and VP4 form oligomeric structures. *Journal of Virology*. **64**:2632-2641.
111. **Matsui S.M., Mackow E. R., Greenberg H.B.** 1989. Molecular determinant of rotavirus neutralization and protection. *Advances in Virus Research*. **36**:181-214.

112. **Mattion N.M., Cohen J., Aponte C., Estes M.K.** 1992. Characterization of an oligomerization domain and RNA-binding properties on rotavirus non-structural protein NS34. *Virology*. **190**:68-83.
113. **Mattion N.M., Mitchell D. B., Both G.W., Estes M.K.** 1991. Expression of rotavirus proteins encoded by alternative open reading frames of genome segment 11. *Virology*. **181**:295-304.
114. **McCrae M.A., McCorquodale J. G.** 1983. Molecular biology of rotavirus. V. Terminal structure of viral RNA species. *Virology*. **126**:435-443.
115. **McManus M.T., Haines B. B., Dillon C.P., Whitehurst C.E., van Parrijs L., Chen J., Sharp P.A.** 2002. Small interfering RNA-mediated gene silencing in T lymphocytes. *The Journal of Immunology*. **169**:5754-5760.
116. **McManus M.T., Petersen C. P., Haines B.B., Chen J., Sharp P.A.** 2002. Gene silencing using micro-RNA designed hairpins. *RNA*. **8**:842-850.
117. **Mette M.F., Aufsatz W., van der Winden J., Matzke M.A., Matzke A.J.** 2000. Transcriptional silencing and promotor methylation triggered by double-strand RNA. *EMBO Journal*. **19**:5194-5201.
118. **Michelangeli F, Ruiz M.** 1991. Effect of rotavirus infection on intracellular calcium homeostasis in cultured cells. *Virology*. **181**:520-527.
119. **Michelangeli F., Liprandi F., Chemello M.E., Ciarlet M., Ruiz M.C.** 1995. Selective depletion of stored calcium by thapsigargin blocks rotavirus maturation but not the cytopathic effect. *Journal of Virology*. **69**:3838-3847.
120. **Mirazimi A., von Bonsdorff B. C. H., Svensson L.** 1996. Effect of brefeldin A on rotavirus assembly and oligosaccharide processing. *Virology*. **217**:554-563.
121. **Mitchell D.B., Both G. W.** 1990. Completion of the genomic sequence of the simian rotavirus SA11: nucleotide sequences of segments 1, 2 and 3. *Virology*. **177**:324-331.
122. **Miyagishi M., Taira K.** 2002. U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells. *Nature Biotechnology*. **19**:497-500.
123. **Mohan K.V.K., Som I., Atreya C.D.** 2002. Identification of a type 1 peroxisomal targeting signal in a viral protein and demonstration of its targeting to the organelle. *Journal of Virology*. **76**:2543-2547.

124. **Montgomery M.K., Xu S., Fire A.** 1998. RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. Proceedings of the National Academy of the Sciences USA. **95**:15502-15507.
125. **Mourelatos Z., Dostie J., Paushkin S., Sharma A., Charroux B., Abel L., Rappsilber J., Mann M., Dreyfuss G.** 2002. miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins contain numerous microRNAs. *Genes and Development*. **16**:720-728.
126. **Mourrain P., Beclin C., Elmayan T., Feuerbach F., Godon C., Morel J., Jouette D., Lacombe A., Nikic S., Picault N., Remoue K., Sanial M., Vo T., Vaucheret H.** 2000. *Arabidopsis* SGS2 and SGS3 genes are required for post-transcriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell*. **101**:533-542.
127. **Munroe S., Pelham H. R. B.** 1987. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell*. **48**:899-907.
128. **Nandi P., Charpilienne A., Cohen J.** 1992. Interaction of rotavirus particles with liposomes. *Journal of Virology*. **66**:3363-3367.
129. **Napoli C., Lemieux C., Jorgensen R.** 1990. Introduction of a chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell*. **2**:279-289.
130. **Nishikura K.** 2001. A short primer on RNAi: RNA-directed RNA polymerase acts as a key catalyst. *Cell*. **107**:415-418.
131. **Novina C.D., Murray D. M., Dykxhoorn P.J., Beresford J., Riess S-K, Lee R.G., Collman J., Lieberman P., Shankar P., Sharp P.A.** 2002. siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection. *Nature Medicine*. **8**:681-686.
132. **Nykanen A., Haley P., Zamore P.D.** 2001. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell*. **107**:309-321.
133. **Offit P., Blauat G., Grennberg H.B., Clark H.F.** 1986. Molecular basis of rotavirus virulence role of gene segment 4. *Journal of Virology*. **57**:46-49.
134. **Okada J., Kobayashi N., Taniguichi K., Urasawa S.** 1999. Analysis of reassortment of rotavirus NSP1 genes lacking coding region for cysteine-rich zinc finger motif. *Archives of Virology*. **144**:345-353.

135. **Olsen P.H., Ambros V.** 1999. The *lin-4* regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Developmental Biology*. **216**:671-680.
136. **Paddison P.J., Caudy A. A., Bernstein E., Hannon G.J., Conklin D.S.** 2002. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes and Development*. **16**:948-958.
137. **Paddison P.J., Cavely A. A., Hannon G.J.** 2002. Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. **99**:1443-1448.
138. **Paddison P.J., Hannon G. J.** 2002. RNA interference: the new somatic cell genetics?. *Cancer Cell*. **2**:17-23.
139. **Patton J.T.** 1996. Rotavirus VP1 alone specifically binds to the 3' end of viral mRNA, but the interaction is not sufficient to initiate minus-strand synthesis. *Journal of Virology*. **70**:7940-7947.
140. **Patton J.T., Gallegos C. O.** 1990. Rotavirus RNA replication: single stranded RNA extends from the replicase particles. *Journal of General Virology*. **71**:1087-1094.
141. **Paul C.P., Good P. D., Winer I., Engelke D.R.** 2002. Effective expression of small interfering RNA in human cells. *Nature Biotechnology*. **29**:505-508.
142. **Pelham H.R.B.** 1991. Recycling of proteins between the endoplasmic reticulum and Golgi complex. *Current Opinion in Cell Biology*. **3**:585-591.
143. **Petrie B.L.** 1983. Biologic activity of rotavirus particles lacking glycosylated proteins, *En B. D. Compas RW* (ed.), *Double-stranded RNA viruses*. Elsevier, New York., pp. 146-156.
144. **Petrie B.L., Greenberg H. B., Graham D.Y., Estes M.K.** 1984. Ultrastructural localization of rotavirus antigens using colloidal gold. *Virus Research*. **1**:133-152.
145. **Piron M., Delaunay T. P., Grosclaude J., Poncet D.** 1999. Identification of the RNA-binding, dimerization, and eIF4G-binding domains of rotavirus nonstructural protein NSP3. *Journal of Virology*. **73**:5411-5421.

146. **Piron M., Vende P., Cohen J., Poncet D.** 1998. Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4G and evicts the poly(A) binding protein from the eIF4F. *EMBO Journal*. **17**:5811-5821.
147. **Plasterk R.H.A.** 2002. RNA silencing, the genome's immune system. *Science*. **296**:1263-1265.
148. **Poncet D., Aponte C., Cohen J.** 1993. Rotavirus protein NSP3 (NS34) is bound to the 3' end consensus sequence on viral mRNAs in infected cells. *Journal of Virology*. **67**:3159-3165.
149. **Poncet D., Lindenbaum S., Cohen J.** 1994. Four nucleotides are the minimal requirement for RNA recognition by rotavirus non-structural protein NSP3. *EMBO Journal*. **13**:4165-4173.
150. **Pourochynsky MS, Atkinson P.** 1991. Rotavirus proteins rearrangements in purified membrane-enveloped intermediate particles. *Journal of Virology*. **65**:4720-4727.
151. **Pourochynsky MS, Mass D., Atkinson PH** 1991. Calcium depletion blocks the maturation of rotavirus by altering the oligomerization of virus-encoded proteins in the RE. *Journal of Cell Biology*. **114**:2199-2209.
152. **Ramig R.F., Petrie B. L.** 1984. Characterization of temperature-sensitive mutants of simian rotavirus SA11: protein synthesis and morphogenesis. *Journal of Virology*. **49**:665-673.
153. **Randall G., Grakoui A., Rice C.M.** 2003. Clearance of replicating hepatitis C virus replicon RNAs in cell culture by small interfering RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. **100**:235-240.
154. **Ratcliff F., Harrison B. D., Baulcombe D.C.** 1997. A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science*. **276**:1558-1560.
155. **Reinhart B.J., Slack F. J., Basson M., Pasquinelli A.E., Bettinger J.C., Rougvi A.E., Horvitz H.R., Ruvkun G.** 2000. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. **403**:901-906.
156. **Ruggeri F.M., Greenberg H. B.** 1991. Antibodies to the trypsin cleavage peptide VP8 neutralize rotavirus by inhibiting binding of virions to target cell in culture. *Journal of Virology*. **65**:2211-2219.

157. **Ruiz M.C., Alonso-Torre S. R., Charpilienne A., Vasseur M., Michelangeli F., Cohen J., Alvarado F.** 1994. Rotavirus interaction with isolated membrane vesicles. *Journal of Virology*. **68**:4009-4016.
158. **Ruiz M.T., Voinnet O., Baulcombe D.C.** 1998. Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell*. **10**:937-946.
159. **Sapin C., Colaid O., Delmas O., Tessier C., Breton M., Enouf V., Chwetzoff S., Ouanich J., Cohen J., Wolf C., Trugnan G.** 2002. Rafts promote assembly and atypical targeting of a nonenveloped virus, rotavirus, in Caco-2 cells. *Journal of Virology*. **76**:4591-4602.
160. **Schwartz D.S., Hutvagner G., Haley B., Zamore P.D.** 2002. Evidence that siRNAs function as guides, not primers, in the *Drosophila* and Human RNAi pathways. *Molecular Cell*. **10**:537-548.
161. **Shahrabadi M.S., Lee P. W. K.** 1986. Bovine rotavirus maturation is a calcium-dependent process. *Virology*. **152**:298-307.
162. **Sharp P.A.** 1999. RNAi and double-strand RNA. *Genes and Development*. **13**:139-141.
163. **Shaw A.L., Rothnagel R., Chen D., Raming R.F., Chiu W., Prasad B.V.V.** 1993. Three-dimensional visualization of the rotavirus haemagglutinin structure. *Cell*. **74**:693-701.
164. **Shi H., Djikeng A., Mark T., Wirtz E., Tschudi C., Ulli E.** 2000. Genetic interference in *Trypanosoma brucei* by heritable and inducible double-stranded RNA. *RNA*. **6**:1069-1076.
165. **Sijen T., Fleenor J., Simmer .F, Thijssen K.L., Parrish S., Timmons L., Plasterk R.H.A., Fire A.** 2001. On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell*. **107**:465-476.
166. **Slack F.J., Basson M., Liu Z., Ambros V., Horvitz H.R., Ruvkun G.** 2000. The *lin-41* RBCC gene acts in th *C. elegans* heterochronic pathway between the *let-7* regulatory RNA and the *LIN-29* transcription factor. *Molecular Cell*. **5**:659-669.
167. **Sui G., Soohoo C., Affar el B., Gay F., Shi Y., Forrester W.C., Shi Y.** 2002. A DNA-vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. **99**:5515-5520.

168. **Svensson L., Dortmitzer P. R., von Bonsdorff C., Maunula L., Greenberg H.B.** 1994. Intracellular manipulation of disulfide bond formation in rotavirus proteins during assembly. *Journal of Virology*. **68**:5204-5215.
169. **Svoboda P., Stein P., Hayashi H., Schultz R.M.** 2000. Selective reduction of dormant maternal mRNAs in mouse oocytes by RNA interference. *Development*. **127**:4147-4156.
170. **Tabara H., Griskock A., Mello C.C.** 1998. RNAi in *C. elegans*-soaking in the genome sequence. *Science*. **282**:430-431.
171. **Tabara H., Sarkissian M., Kelly W.G., Fleenor J., Grishock A., Timmons L., Fire A., Mello C.C.** 1999. The *rde-1* gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell*. **99**:123-132.
172. **Tam J.S., Szymanski M. T., Middleton P.J., Petric M.** 1976. Studies on the particles of infantile gastroenteritis virus (orbivirus group). *Intervirology*. **7**:181-191.
173. **Taylor J.A., O'Brien B. J. A., Lord V.J., Meyer J.C., Bellamy A.R.** 1993. RER-localized rotavirus intracellular receptor: a truncated purified soluble form is multivalent and binds virus particles. *Virology*. **194**:807-814.
174. **Tenllado F., Ruiz-Díaz. J. R.** 2001. Double-stranded RNA-mediated interference with plant virus infection. *Journal of Virology*. **75**:12288-12297.
175. **Tihova M., Dryden K. A., Bellamy R., Greenberg H.B., Yeager M.** 2001. Localization of membrane permeabilization and receptor binding sites on the VP4 hemagglutinin of rotavirus: implications for cell entry. *Journal of Molecular Biology*. **314**:985-992.
176. **Timmons L., Fire A.** 1998. Specific interference by ingested dsRNA. *Nature*. **395**:854.
177. **Valenzuela S., Pizarro J., Sandino A.M., Vazquez M., Fernandez J., Hernandez O., Patton J., Spencer E.** 1991. Photoaffinity labeling of rotavirus VP1 with 8-azido-ATP: identification of the viral RNA polymerase. *Journal of Virology*. **65**.
178. **Van der Krol A.R., Mur L. A., Beld M., Mol J.N., Stitje A.R.** 1990. Flavonoid genes in *Petunia*: addition of a limited number of genes copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell*. **2**:291-299.

179. **Voinett O., Pinto Y. M., Baulcombe D.C.** 1999. Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. **23**:14147-14152.
180. **Voinnet O., Lederer C., Baulcombe D.C.** 2000. A viral movement proteins prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana bethamiana*. *Cell*. **103**:157-167.
181. **Wasseneger M., Heimes S., Riedel L., Sanger H.L.** 1994. RNA-directed *de novo* methylation of genomic sequences in plants *Cell*. **76**:567-576.
182. **Waterhouse Pang M., W. M. B., Lough T.** 2001. Gene silencing as an adaptive defense against viruses. *Nature*. **411**:834-842.
183. **Whitteld P.L., Tyndall C., Stirzaker S.C., Bellamy A.R., Both G.W.** 1987. Location of sequences within rotavirus SA11 glycoprotein VP7 which direct to the endoplasmic reticulum. *Molecular Cell Biology*. **7**:2491-2497.
184. **Wianny F., Zernicka-Goetz M.** 2000. Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. *Nature Cell Biology*. **2**:70-75.
185. **Wightman B., Ha I., Ruvkun G.** 1993. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. **75**:855-862.
186. **Winston W.M., Molodowitch C., Hunter C.P.** 2002. Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1. *Science*. **295**:2456-2459.
187. **Wu-Scharf D., Jeong B., Zhang C., Cerutti H.** 2000. Transgene and transposon silencing in *Chlamydomonas reinhardtii* by a DEAH-box RNA helicase. *Science*. **290**:1159.
188. **Yeager M., Berriman J. A., Baker T.S., Bellamy A.R.** 1994. Three-dimensional structure of the rotavirus haemagglutinin VP4 by cryo-electron microscopy and difference map analysis. *EMBO Journal*. **13**:1011-1018.
189. **Yu J-Y, DeRuiter S. L., Turner D.L.** 2002. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. **99**:6047-6050.

190. **Zamore P.D., Tuschl T., Sharp P.A., Bartel D.P.** 2000. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*. **101**:25-33.
191. **Zamore PD** 2002. Ancient pathways programmed by small RNAs. *Science*. **296**:1265-1269.
192. **Zarate S., Cuadras M. A., Espinosa R., Romero P., Juárez K.O., Camacho M., Arias C.F., López S.** 2003. The interaction of rotaviruses with hsc70 during cell infection is mediated by VP5 Sometido a.
193. **Zarate S., Espinosa R., Romero P., Guerrero C.A., Arias C.F., López S.** 2000. Integrin alpha2beta1 mediates the cell attachment of the rotavirus neuraminidase-resistant variant nar3. *Virology*. **278**:50-54.
194. **Zárate S., Espinosa R., Romero P., Mendez E., Arias C.F., López S.** 2000. The VP5 domain of VP4 can mediate attachment of rotavirus to cells. *Journal of Virology*. **74**:593-599.
195. **Zeng C.Q., Estes M. K., Charpilienne A., Cohen J.** 1998. The N terminus of rotavirus VP2 is necessary for encapsidation of VP1 and VP3. *Journal of Virology*. **72**:201-208.
196. **Zeng Y., Cullen B. R.** 2002. RNA interference in human cells is restricted to the cytoplasm. *RNA*. **8**:855-860.