

00551



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

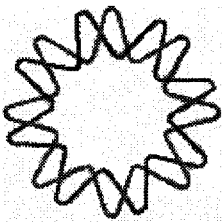
FUNCION DE LA PROTEINA NSP5 EN EL CICLO
REPLICATIVO DE ROTAVIRUS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS
P R E S E N T A :
MARGARITO ROJAS JACINTO

Director de Tesis: Dr. Tomás David López Díaz

CUERNAVACA, MORELOS

DICIEMBRE, 2005



0349939



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.

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

NOMBRE: Margarita Rojas Jacinto

FECHA: 15 Nov 2005

FIRMA: [Firma]

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

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

Agradecimientos.

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

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

A mis sinodales: Dr. Mario Soberón, Dra. Hilda Lomelí, Dr. Ramón González y Dr. Gustavo Pedraza, por aceptar revisar mi tesis, por sus comentarios y sugerencias.

A todo el grupo Arias/López: Tomás, Margara, Liliana, Rosa, Ernesto, Pavel, Marisol, Jimena, Jesús, Gaby, Pedro, Rafa, Camilo, Claudia, Rocío, Claudia M., Martha, Daniela, Magali, Michelle, Mauricio y Viky por que hacen cada día más agradable.

A Rosa, Liliana, Camilo, Mery Pi, Miriam y Pachequin, por lo bien que la hemos pasado visitando lugares extraños.

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

	Página
Abreviaturas	vii
Resumen	2
Introducción	3
Los rotavirus	3
Patogénesis viral	5
Generalidades de los rotavirus	6
Genoma viral	7
Proteínas estructurales	9
Proteínas no estructurales	11
Ciclo replicativo de Rotavirus	18
La interferencia por siRNAs	22
Antecedentes	25
Justificación	26
Hipótesis	27
Objetivo	28
Material y Métodos	29
Resultados	38
Apéndice	54
Discusión	70
Conclusiones	76

Perpectivas

77

Bibliografía

78

Abreviaturas

aa	aminoácido
DLP	partícula viral de doble capa proteica
DNA.	ácido desoxirribonucleico
H	hora
mA	miliampers
MEM	medio mínimo esencial
μl	microlitros
ml	mililitros
mM	milimolar
μM	micromolar
moi	multiplicidad de infección (# de partículas virales por célula)
NSPs	proteínas virales no estructurales.
Pb	pares de bases
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
RNA	ácido ribonucleico

RNA_{dc}	ácido ribonucleíco de doble cadena
RNA_i	interferencia por RNA
RNA_m	RNA mensajero
RNA_{pol}	RNA polimerasa
Rnasa	Ribonucleasa
rpm	revoluciones por minuto
RRV	cepa de rotavirus del mono <i>Rhesus</i>
siRNA	RNA pequeño interferente
siNSP5	siRNA contra el RNA _m de la proteína NSP5
siLamA/C	siRNA contra el RNA _m de la proteína lamina
s/s	sin suero fetal bovino
TLP	partícula de tres capas proteicas
VLPs	partícula semejantes a virus
V	volts
v/v	volumen/volumen
YM	Cepa de rotavirus porcina

Resumen

Los Rotavirus son la causa principal de gastroenteritis en niños menores de 3 años. En el ciclo replicativo de estos virus los RNAm virales pueden ser utilizados como templado para la síntesis de proteínas o para la síntesis de RNAdc. La replicación, el inicio de la morfogénesis viral y empaquetamiento del genoma viral se lleva a cabo en los viroplasmos (acumulaciones de proteína y RNA viral). Una proteína importante en la formación de los viroplasmos es NSP5, la cual sufre dos tipos de modificaciones post-traduccionales, la fosforilación y la O-glicosilación; sin embargo, no se ha determinado el papel de estas modificaciones en la función de NSP5. Ensayos de fosforilación *in vitro* sugieren que caseína cinasa (CKI) o una cinasa parecida podría fosforilar a NSP5, pero esto no ha sido demostrado *in vivo*. Recientemente se ha utilizado la técnica "RNA de interferencia" (RNAi) para inhibir la expresión de la proteína NSP5. El silenciamiento de NSP5 condujo a una disminución en: la síntesis de proteínas y RNA viral y a una reducción en la producción de partículas infecciosas purificadas por gradientes de CsCl; y en estos gradientes se observó la formación de bandas extras no caracterizadas (posiblemente intermediarios de replicación o partículas mal ensambladas). Para conocer más acerca de la función de NSP5 en el ciclo replicativo de rotavirus, en este trabajo se utilizó la técnica RNAi e inhibidores de CKI.

El análisis de las bandas extras, producidas en gradientes de CsCl, obtenidas a partir de células tratadas con un siRNA (siNSP5) contra el gen 11 (que codifica para NSP5) mostró que estas bandas contienen todas las proteínas características de un virión maduro excepto VP1, lo cual sugiere que pueden ser partículas virales, pero se descarta que correspondan a intermediarios de replicación. Adicionalmente, el análisis por RT-PCR en tiempo real indicó que estas bandas contienen pequeñas cantidades de RNA viral. Siguiendo la cinética de síntesis de proteínas y RNAm en células tratadas con un siControl logramos identificar un primer y un segundo ciclo de transcripción viral. Silenciando la expresión de NSP5 observamos que el primer ciclo de transcripción no depende de NSP5 a diferencia del segundo ciclo. Para averiguar si la fosforilación de NSP5 tenía relevancia en el ciclo replicativo de rotavirus, células infectadas con rotavirus fueron tratadas con los inhibidores de CKI, IC261 y D4476 y el inhibidor de cinasas H7. Los tres inhibidores condujeron a una disminución en la fosforilación de NSP5, lo cual sugiere que CKI participa en la fosforilación de NSP5 *in vivo*, además estas drogas redujeron la producción de progenie viral; sin embargo no encontramos una correlación en cuando a síntesis de proteínas virales. Concluimos que en la infección por rotavirus existe un segundo ciclo de transcripción que depende de la síntesis de NSP5 y la inhibición de este segundo ciclo explica la disminución en la síntesis de proteínas, RNAm y RNAdc observado en células tratadas con el siNSP5. Finalmente concluimos que una de las cinasas que participa en la fosforilación de NSP5 *in vivo* es CKI.

Introducción

Los rotavirus

Los rotavirus representan la principal causa de gastroenteritis viral en niños menores de 2 años y en las crías de muchas especies animales, incluyendo algunas de importancia económica para el hombre (Estes & Cohen, 1989, Lopez, 2003).

La infección por rotavirus es muy común. El pico de incidencia de la infección por rotavirus ocurre entre los 6 y 24 meses de edad, y a los 5 años el 95% de los niños ya han sido infectados. Cada año rotavirus causa aproximadamente 111 millones de episodios de gastroenteritis en niños; lo cual resulta en 25 millones de visitas al médico, 2 millones de hospitalizaciones y de 352,000 a 592,000 muertes, de estas el 82% ocurren en países en desarrollo (Ramig, 2004). Una vez que rotavirus infecta a los niños, el periodo de incubación oscila entre 24 y 48 h; este virus causa una enfermedad que dura aproximadamente una semana y se caracteriza por: diarreas crónicas, fiebre, vómito y deshidratación. La severidad de la enfermedad varía desde una infección asintomática hasta una gastroenteritis deshidratante severa que puede llevar a la muerte. En el zenit de la enfermedad la producción de virus en el intestino alcanza las 10^{11} partículas/mL. La infección aguda por rotavirus es seguida por una respuesta humoral que comprende a las inmunoglobulinas IgM, IgG, IgA y a células T en el intestino delgado (Carmichael, 2002). La infección en adultos regularmente es asintomática; pero, ocasionalmente se presentan los síntomas en los padres de niños infectados, en pacientes inmunocomprometidos y en adultos de la tercera edad (Estes & Cohen, 1989, Lopez, 2003). Por su importancia médica

es necesario ampliar nuestro conocimiento acerca de la biología molecular, inmunología y patogénesis de rotavirus, lo cual permitirá diseñar estrategias útiles en la prevención y tratamiento de la gastroenteritis causada por rotavirus.

Los anticuerpos maternos, de clase IgG, transmitidos a través de la placenta no protegen al recién nacido contra la enfermedad. Los recién nacidos alimentados con leche materna presentan una protección parcial contra las infecciones de rotavirus; posiblemente, por medio de los anticuerpos específicos tipo IgA transmitidos por la madre. Sin embargo, estos anticuerpos tienen una vida media muy corta. La lactancia materna parece posponer la infección por rotavirus hasta después de los seis meses de edad. La epidemiología de la enfermedad sugiere que la inmunidad natural proviene de las reinfecciones por estos virus (Carmichael, 2002).

En niños con inmunodeficiencias en células T y B se desarrollan infecciones crónicas por rotavirus, síntomas prolongados e infecciones extraintestinales; lo cual sugiere que las células T y B son importantes para la inmunidad contra rotavirus. No obstante, las células T y B inducidas por una infección natural son insuficientes en muchos casos para prevenir infecciones sintomáticas o asintomáticas en niños o adultos. La severidad y número de infecciones disminuye con la edad, lo que sugiere la existencia de inmunidad protectora contra rotavirus, que se va desarrollando gradualmente (Carmichael, 2002).

La principal ruta de transmisión de los rotavirus es fecal-oral. La infección por estos virus es independiente de las condiciones higiénicas y sanitarias, por lo que se ha especulado otras vías de contagio como: el contacto persona-persona, el contacto con secreciones

respiratorias y/o el contacto con superficies contaminadas. En general, la transmisión de la enfermedad es especie-específica; sin embargo, estudios de hibridación RNA-RNA han mostrado que algunas cepas aisladas en humano son recombinaciones entre cepas de origen humano y cepas de origen animal, lo que sugiere que podría haber transmisión entre especies (Carmichael, 2002, Lopez, 2003, Ramig, 2004).

Varios modelos animales han sido utilizados para investigar la patogénesis e inmunidad de la enfermedad por rotavirus. Ratones, ratas y conejos han servido como modelos; pero, es difícil trabajar con estos animales, ya que después de algunas semanas de nacidos son inmunes a la infección por rotavirus (Carmichael, 2002, Lopez, 2003, Ramig, 2004).

Patogénesis viral

El tropismo de los rotavirus está limitado a los enterocitos maduros, localizados en las puntas de las microvellosidades del intestino delgado (Ramig, 2004). Se ha propuesto que la diarrea causada por rotavirus se debe en parte a la destrucción de los enterocitos, con lo cual disminuye la absorción de Na^+ y agua. La mala absorción resulta en la acumulación de grasas, proteínas, mono y disacáridos y carbohidratos no digeridos; que pueden circular a través del colon y generar una diarrea osmótica. Recientemente, se ha propuesto que la proteína no estructural NSP4 puede contribuir a la diarrea. Esta proteína causa la liberación de calcio del retículo endoplásmico al espacio intracelular y en consecuencia, se disparan varios procesos celulares que incluyen: la interrupción de los filamentos que forman la red del citoesqueleto, disminución en el transporte de Na^+ soluble y necrosis. Estos eventos contribuyen a una absorción deficiente por parte del

intestino. La infección por rotavirus tiene otros efectos en los enterocitos infectados, por ejemplo: desajuste en las concentraciones de sodio (Na⁺) y potasio (K⁺) (resultando en la pérdida de fluidos), disminución en la síntesis de enzimas digestivas en la superficie de los enterocitos (Carmichael, 2002, Ciarlet & Estes, 2001, Ramig, 2004, Zhang et al., 2000). Para resumir, la diarrea por rotavirus claramente es una enfermedad ocasionada por muchos factores.

Generalidades de los rotavirus

Los rotavirus fueron descubiertos en 1973 por Ruth Bishop y colaboradores al encontrar la presencia de partículas virales en células del intestino delgado de niños con diarrea severa no bacteriana. Posteriormente, se propuso el nombre de rotavirus (del latín rota = rueda) en base a su morfología; actualmente, se clasifican como un género de la familia *Reoviridae* (Estes & Cohen, 1989, Lopez, 2003).

Por microscopía electrónica se han identificado tres tipos de partículas: las TLP's (partículas de tres capas), las DLP's (partículas de dos capas) y el "core" (Estes & Cohen, 1989, Gilber et al., 2001, Lopez, 2003). El genoma de rotavirus se compone de 11 segmentos de RNA de doble cadena (RNA_{dc}) (Fig. 1 a). La replicación, empaquetamiento del genoma e inicio de la morfogénesis se lleva a cabo en el citoplasma celular dentro de estructuras llamadas viroplasmos. Los viroplasmos son acumulaciones de las proteínas estructurales (VP's por "viral protein") VP1, VP2, VP3, VP6, y las proteínas no estructurales del virus (NSP's por "Non Structural Protein"), NSP2, NSP5 y NSP6, así como de RNA viral.

Los viroplasmos vistos al microscopio electrónico aparecen como estructuras electrodensas (Estes & Cohen, 1989, Gilber et al., 2001, Lopez, 2003).

El "core" de rotavirus contiene el RNAdc, está compuesto por 60 dímeros de la proteína VP2 (94 KDa); por pequeñas cantidades de la polimerasa dependiente de RNA (VP1) y por la guanilil-transferasa (VP3) (Fig. 1 c) (Liu et al., 1992, Vasquez et al., 1993, Zeng et al., 1994). Las DLPs contienen el "core" rodeado por 780 moléculas de la proteína VP6, agrupadas en 260 trímeros, a éstas partículas se les asocia la actividad de transcriptasa, ya que son la fuente del RNAm viral en la célula (Fig. 1d). Las TLP's contienen a las DLP's rodeadas por capa compuesta por 780 moléculas de la glicoproteína VP7 y por 60 espículas formadas por dímeros de VP4 (88 KDa), la hemaglutinina viral, VP4. Las partículas de tres capas, TLPs, constituyen un virión maduro cuya simetría es T=13 (Fig. 1 b) (Charpillienne et al., 2002, Gilber et al., 2001, Lepault et al., 2001, Patton, 2001, Patton et al., 1997).

Genoma viral

El genoma de rotavirus se compone de 11 segmentos de RNAdc, cada uno codifica para una proteína, excepto el gen 11, el cual codifica para dos proteínas. Los genes de rotavirus se transcriben dentro de las DLPs. Los RNA mensajeros (RNAm) salen de las DLP's hacia el citoplasma celular a través de poros formados por VP2, estos se localizan en los 5 ejes icosaédricos de la cápside (Fig. 1f) (Patton, 2001, Patton et al., 1997, Patton & Spencer, 2000). El marco de lectura abierto de cada gen está flanqueado por

regiones 5' y 3' que no se traducen (UTRs), pero que forman estructuras tallo asa importantes en la transcripción y replicación. Los RNAm de rotavirus contienen la estructura 5'-CAP, pero carecen de la cola de Poli A en el extremo 3' (Patton et al., 1996). Durante la replicación viral el RNAm puede ser traducido a proteínas o puede ser utilizado como templado para la síntesis de RNAdc (Fig. 6) (Estes & Cohen, 1989, Lopez, 2003). Se han identificado 3 señales en los RNAm importantes para la síntesis de RNAdc; dos de ellas incrementan la síntesis de RNAdc y una es esencial para las síntesis de la cadena negativa (Patton et al., 1997, Patton & Spencer, 2000, Pesavento et al., 2001).

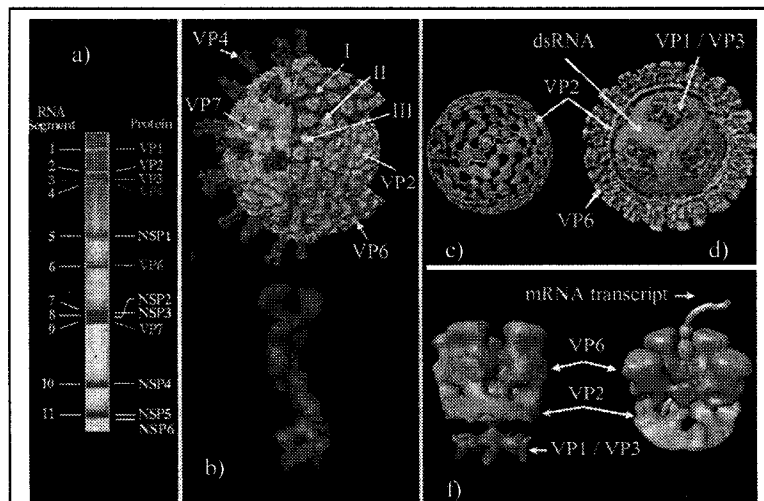


Figura 1. Representación esquemática de los Rotavirus. a) Se muestra el patrón electroforético de los once segmentos de RNAdc del genoma viral, así como las proteínas para las que codifican. b) Reconstrucción de imagen de la estructura tridimensional de un virión maduro (TLP) y de una espícula de VP4;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

Proteínas estructurales.

La proteína VP1 (125 KDa) está codificada por el segmento de RNAdc 1 (Gen 1) y es considerada una RNA polimerasa dependiente de RNA por: 1) tener motivos de RNA polimerasa en su secuencia, 2) por su afinidad a nucleótidos, 3) por ser un componente de los complejos intermediarios de replicación (RIs) (ver ciclo de replicación) y 4) por reconocer específicamente el 3' terminal de los RNAm. Sin embargo, VP1 carece de actividad de polimerasa en ausencia de VP2 (Estes & Cohen, 1989, Lopez, 2003, Patton & Spencer, 2000).

La proteína más abundante del "core", VP2 (94 KDa) está codificada por el gen 2. VP2 tiene actividad inespecífica de unión a RNA e interactúa directamente con RNAdc. En experimentos de reconstitución utilizando proteínas purificadas, se ha encontrado que VP2 es esencial en la actividad de replicación y cuando se expresa por sí sola con el sistema de baculovirus se ensambla en partículas similares al "core". En células infectadas VP2 se localiza en viroplasmos (Gonzalez et al., 2000, Patton, 2001, Patton et al., 1997, Vende et al., 2003, Zeng et al., 1994).

La proteína VP3 (88 KDa) es codificada por el gen 3 de rotavirus. A esta proteína se le atribuye la actividad de guanilil-transferasa del RNA viral por tener: 1) motivos estructurales de guanilil transferasas y 2) unir GTP de modo covalente en una reacción reversible (necesaria para la síntesis de RNAm maduros) (Liu et al., 1992, Patton et al., 1997, Patton & Spencer, 2000, Vasquez et al., 1993).

La proteína VP4 (88 KDa) está codificada por el gen 4 de rotavirus, esta proteína forma espículas que se proyectan de la tercera capa del virión; además, tiene funciones esenciales en el ciclo replicativo del virus, incluyendo la unión al receptor y la penetración a la célula. El tratamiento de VP4 con tripsina origina dos polipéptidos de menor peso molecular, llamados VP5 (60 KDa) y VP8 (28 KDa). El procesamiento de VP4 con tripsina se requiere para la entrada eficiente del virus a la célula; pero, no es requerido para la unión (Estes & Cohen, 1989, Lopez, 2003). Durante la infección VP4 se observa asociada a viroplasmos; aunque, también se han visto formas filamentosas posiblemente, por asociación con citoesqueleto (Gonzalez et al., 2000).

La proteína más abundante de la cápside, VP6 (41 KDa) es codificada por el gen 6. Esta proteína interacciona con VP2 hacia el interior de la partícula y con VP4 y VP7 en la capa externa del virión (Charpilienne et al., 2002). VP6 es esencial para la actividad de transcriptasa; pero, no para la replicación (Charpilienne et al., 2002, Gilber et al., 2001, Patton et al., 1996). Durante una infección VP6 se observa en asociación con viroplasmos. Se han observado formas filamentosas de VP6 en células BHK transfectadas con un replicón que contiene el gen 6 de rotavirus, además *in vitro* se ha observado que VP6 puede formar estructuras tubulares (Gonzalez et al., 2000, Nilsson et al., 1998).

La glicoproteína VP7 (37 KDa) es codificada por el gen 7, 8, ó 9 dependiendo de la cepa de rotavirus que se analice. Junto con VP4 forma la capa externa del virión y es responsable de los primeros contactos con la célula. La proteína VP7 es glicosilada cotraduccionalmente a medida que se inserta en el lumen del retículo endoplásmico (RE); esta proteína contiene únicamente oligosacáridos del tipo de alta manosa. La secuencia

nucleotídica del gen para VP7 predice dos marcos abiertos, ambos codones de inicio preceden regiones hidrofóbicas (llamadas H1 y H2) que tienen el potencial de funcionar como péptidos señal para dirigir la síntesis de VP7 al RE (Estes & Cohen, 1989, Lopez, 2003). Una vez sintetizada, VP7 es retenida en la membrana del RE; sin embargo, no contiene la secuencia típica de retención en RE (KDEL), la retención se asocia con los aminoácidos ITG en las posiciones 9-11 de VP7. La distribución de esta proteína durante la infección es en formas semicirculares que rodean a los viroplasmos y colocaliza con VP4 y NSP4 (Gonzalez et al., 2000).

Proteínas no estructurales.

Las proteínas no estructurales de rotavirus, NSP1 a NSP6 son codificadas por los segmentos de RNA_{dc} 5, 7, 8, 10 y 11, respectivamente. Estas proteínas no forman parte de la estructura del virión. Durante la infección tienen funciones relacionadas con: 1) el control de la síntesis de proteínas celulares y virales, 2) la replicación del genoma, 3) el empaquetamiento de los genes virales y 4) con la maduración de la partícula viral en el interior de la célula; aunque, todavía no se define completamente el papel de cada una de ellas en estas funciones (Estes & Cohen, 1989, Lopez, 2003).

La proteína NSP1 es codificada por el gen 5. Tiene un motivo tipo dedo de zinc similar al de factores de transcripción eucarióticos TFIIIA, el cual es requerido para su unión específica con los 11 RNAm (Patton, 1995). Esta proteína interacciona con el factor regulador de interferón (INF), IFR-3. A diferencia de células infectadas con una cepa que tiene una NSP1 truncada, en células infectadas con una cepa silvestre, la cantidad de

IFR-3 es menor que la encontrada en células no infectadas. Por otra parte, células tratadas con un siRNA-NSP1 muestran que NSP1 no es esencial para el ciclo replicativo de rotavirus, pero que se requiere para la infección de células vecinas. Estos datos sugieren que NSP1 puede funcionar como un modulador de la respuesta inmune innata. Esta proteína podría ser un antagonista de la vía de señalización de INF, promoviendo la degradación de IFR-3 en células infectadas (Graff et al., 2002, Barro & Patton, 2005).

La proteína NSP2 (35 KDa) está codificada por el gen 8. Se autoensambla en octámeros (Estes & Cohen, 1989, Lopez, 2003) y se ha reportado que tiene actividad de NTPasa dependiente de Mg^{+2} , actividad helicasa independiente de Mg^{+2} y actividad inespecífica de unión a RNA; además, forma parte de los intermediarios de replicación, sugiriendo que NSP2 puede funcionar como un motor molecular que se une a RNAm viral y cataliza su empaquetamiento a través de energía generada por su actividad NTPasa (Estes & Cohen, 1989, Lopez, 2003, Patton, 1995, Patton & Spencer, 2000, Schuck et al., 2001, Taraporewala et al., 1999, Vende et al., 2003). NSP2 interacciona con NSP5 y en células infectadas se observa en asociación con viroplasmos (Fabbretti et al., 1999, Gonzalez et al., 1998). La inhibición de NSP2 con RNAi resulta en la reducción de síntesis de proteínas y RNAdc, así como, en una disminución en la formación de viroplasmos; esto sugiere que NSP2 tiene un papel importante en el ciclo replicativo de rotavirus (Silvestri et al., 2004).

La proteína NSP3 es codificada por el gen 7 de rotavirus; esta proteína se une a los mensajeros virales reconociendo específicamente las cuatro últimas bases (...GACC3'), las cuales forman parte de señales esenciales para la replicación del genoma (revisado en

Estes & Cohen, 1989, Lopez, 2003). Esta proteína interacciona específicamente con el factor de inicio de la traducción celular, eIF4GI. En células eucariontes, eIF4GI es responsable de la interacción entre los ribosomas, el "CAP" de los RNAm y la proteína que une la región poli-(A) (PABP, poly-(A) binding protein) del extremo 3' de los RNAm celulares. Se ha demostrado que NSP3 puede desplazar selectivamente la unión de la PABP con el factor eIF4GI *in vitro* e *in vivo*, mediando la unión de eIF4GI al extremo 3' de los RNAm virales, esta interacción favorece la síntesis de las proteínas virales, interfiriendo con la traducción de los RNAm celulares (Piron et al., 1998). Se ha propuesto que NSP3 le confiere estabilidad al RNAm viral y participa, junto con NSP1, en el proceso de traslocación del RNAm hacia el viroplasma (Padilla-Noriega et al., 2002, Patton, 1995, Patton et al., 1996, Piron et al., 1998).

La glicoproteína, NSP4 (28 KDa) está codificada por el gen 10. Durante la morfogénesis viral, el dominio citoplásmico de NSP4 funciona como un receptor intracelular que une las nuevas partículas de doble capa a través de VP6; esta interacción permite la gemación de las DLP's del viroplasma hacia el lumen del RE. Por otra parte NSP4 sufre un corte proteolítico que origina un péptido de 7 KDa, que es secretado y que puede funcionar como virotoxina. Este péptido purificado a partir de células infectadas con rotavirus o que expresan NSP4 y administrado a ratones neonatos o a células infectadas, muestra actividad de señalización tóxica. Además, este péptido moviliza $[Ca^{+2}]$ cuando es adicionado a cultivos celulares o cuando es expresado en células de insecto (Ball et al., 2005). NSP4 puede unirse a microtúbulos y bloquear el tráfico de vesículas entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi (Ball et al, 2005, Mirazimi et al., 2003, Xu et al., 2000, Zhang et al., 2000).

El gen 11 contiene dos marcos abiertos de lectura que codifican para las proteínas, NSP5 y NSP6 (Fig. 2). La proteína NSP6 (12 KDa) está codificada del nucleótido 80 al 389, interactúa con NSP5 y se acumula en los viroplasmias (Fig. 2) (Gonzalez et al., 1998, Mattion et al., 1991, Torres-Vega et al., 2000). La proteína NSP5 es una fosfoproteína O-glicosilada de 197-200 aa, su secuencia primaria se caracteriza por un alto contenido de serina (20% aproximadamente) y treonina. El papel que tienen las modificaciones post-traduccionales en la función de NSP5 se desconoce (Afrikanova et al., 1996, Blackhall et al., 1998, Gonzalez & Burrone, 1991). La secuencia de aminoácidos de NSP5 predice un peso de entre 21 y 22 Kda; sin embargo, en geles de poliacrilamida se observan diferentes movilidades electroforéticas que oscilan en un rango de 26, 28 y de 30 a 34 KDa, esto se atribuye a diferentes grados de fosforilación de la proteína, ya que el tratamiento con fosfatasas resultan en la formación de una sola banda en geles de poliacrilamida (Afrikanova et al., 1996).

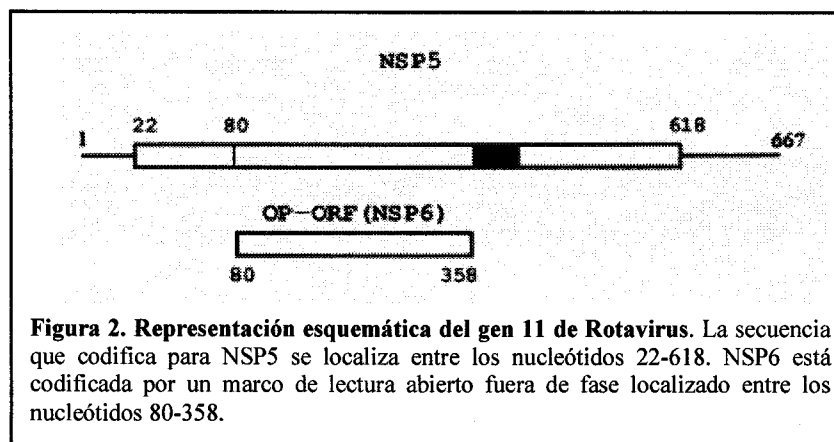
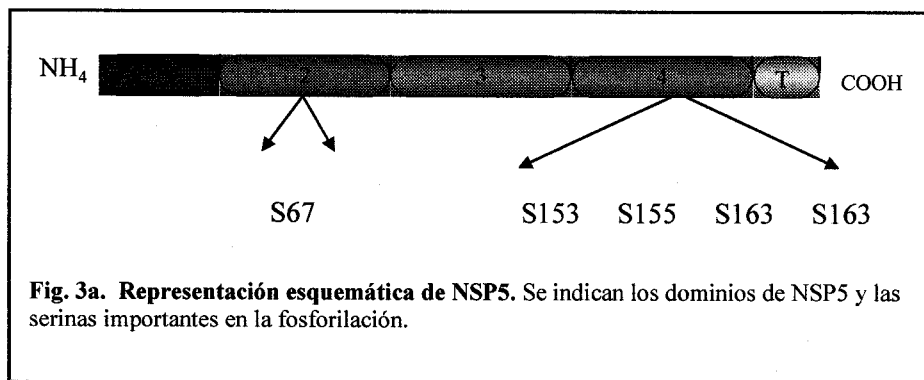


Figura 2. Representación esquemática del gen 11 de Rotavirus. La secuencia que codifica para NSP5 se localiza entre los nucleótidos 22-618. NSP6 está codificada por un marco de lectura abierto fuera de fase localizado entre los nucleótidos 80-358.

Se han identificado diferentes dominios de NSP5, a los cuales se les asocia diferentes papeles en la función de esta proteína (Fig. 3a). El dominio 4, contiene 4 residuos de serina importantes para la fosforilación; el dominio T es requerido para la dimerización, la multimerización y es importante para la función de sustrato y de activación de la fosforilación (ver más adelante); los dominios 1 y T son necesarios en la interacción con NSP2; finalmente, la región involucrada en la interacción con NSP6 ha sido localizada en los aminoácidos 163-197 (Blackhall et al., 1997, Blackhall et al., 1998, Torres-Vega et al., 2000).

A NSP5 se le atribuye actividad autocinasa ya que al producirla en sistemas bacterianos se observan formas fosforiladas, pero no formas hiperfosforiladas (Blackhall et al., 1997). Las formas hiperfosforiladas de NSP5 solo se observan en sistemas eucariontes, lo que sugiere la participación de cinasas celulares en la hiperfosforilación de NSP5 (Blackhall et al., 1998). Se ha propuesto que NSP5 puede ser el sustrato de cinasas y fosfatasas celulares que la fosforilan y defosforilan y que la actividad de estas enzimas puede ser regulada por la misma NSP5. El análisis mutacional de NSP5 ha permitido proponer un modelo en el que NSP5 puede funcionar por un lado como sustrato de fosforilación y por otro como proteína activadora de su propia hiperfosforilación. En estos estudios se observó que la fosforilación de la serina 67 (S67) es importante para la función activadora de NSP5; además se sugiere que la S67 puede ser sustrato de la proteína cinasa 1 (CK1) o de una enzima con actividad similar a CK1 (Eichwald et al., 2004).

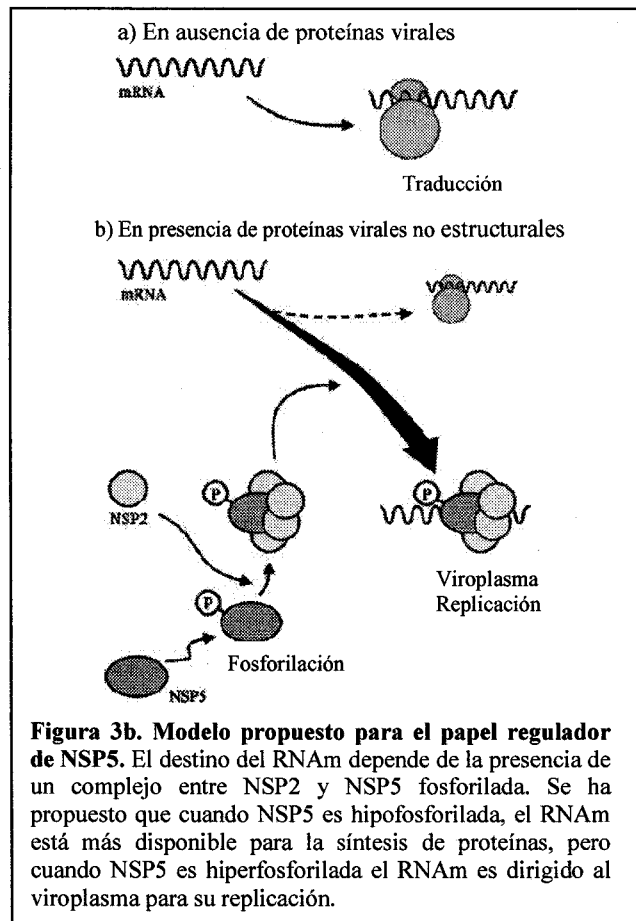
La proteína NSP5 interactúa con VP1, VP6, NSP2, NSP3 y NSP6. La interacción de NSP5 con NSP2 permite la formación de estructuras parecidas a viroplasm (Viroplasm-like) en células transfectadas con NSP2 y NSP5 en ausencia de otras proteínas virales. Por esta razón, se ha propuesto que NSP5 puede ser una proteína de andamiaje para la formación de los viroplasm (Fabbretti et al., 1999). La interacción de NSP2 con NSP5 regula la hiperfosforilación de NSP5. Sin embargo recientemente se ha demostrado que el bloqueo del dominio N-terminal de NSP5, con un péptido de hemaglutinina viral, permite la formación de Viroplasm-like y la hiperfosforilación de NSP5 en ausencia de NSP2 (Mohan et al., 2003).



En células infectadas con rotavirus, NSP5 se asocia a viroplasm; además, es capaz de unirse inespecíficamente a RNA de cadena sencilla y RNAdc (Berois et al., 2003, Chnaiderman Xiao et al., 2002, Eichwald et al., 2004, Vende et al., 2002).

Se ha sugerido que el grado de fosforilación de NSP5 podría dirigir el destino de los RNAm virales hacia la traducción o a la replicación; se propone que a bajos grados de fosforilación de NSP5 el RNAm está más disponible para la traducción, en este modelo la

hiperfosforilación de NSP5 podría favorecer que el RNAm sea dirigido a la replicación (Fig. 3b) (Chnaiderman Xiao et al., 2002). Por otra parte, se ha observado que la unión de NSP5 a VP2 afecta la estabilidad de unión entre VP6 y VP2; por lo que NSP5 podría interactuar con los intermediarios de replicación para impedir la unión de VP6, evitando la formación de viriones incompletos, o bien NSP5 puede impedir la unión de VP6, evitando así el inicio de una transcripción prematura (Berois et al., 2003).



Ciclo Replicativo de Rotavirus

Los rotavirus tienen un tropismo específico por los enterocitos maduros localizados en las vellosidades del intestino delgado; sin embargo, el conocimiento que se tiene acerca de su ciclo de replicación se ha derivado principalmente de estudios realizados en la línea celular derivada de epitelio de riñón del mono reshus, MA104 (Ciarlet & Estes, 2001, Ramig, 2004). Los eventos iniciales de la infección viral consisten de la unión del virus a la superficie celular seguida de la penetración a la célula. El éxito de estos eventos depende del reconocimiento de receptores específicos en las células, los cuales son determinantes del tropismo viral. Actualmente, se sugiere que rotavirus interactúa secuencialmente con varias moléculas de la superficie celular antes de entrar en ella y para ello utiliza diferentes dominios de las proteínas VP4 y VP7. Las proteínas celulares involucradas en la entrada de rotavirus a la célula son: un receptor que contiene ácido siálico, probablemente un gangliósido; las integrinas $\alpha 2\beta 1$, $\alpha \beta 2$, $\alpha \nu \beta 3$ y la proteína hsc70 (Lopez & Arias, 2004). Después de unirse a la célula, el rotavirus se internaliza y pierde la capa externa. Este evento activa la transcripción viral (transcripción primaria). Los transcritos son utilizados para la síntesis de proteínas virales y RNAdc que formará el genoma de la progenie viral. Los RNAm virales pueden traducirse en ribosomas libres (para la mayoría de las proteínas) o asociadas al RE para las proteínas NSP4 y VP7. (Fig. 6) (revisado en Estes & Cohen, 1989, Lopez, 2003).

La replicación del virus y los primeros pasos de la morfogénesis viral se llevan a cabo en los viroplasmos (Fig. 6). En los viroplasmos las proteínas virales y el RNAm viral interactúan para formar intermediarios de replicación (RI) (revisado en Estes and Cohen,

1989 y Lopez, 2003). Se ha propuesto que los intermediarios de replicación se forman a partir de un complejo inicial denominado precoreRI, este complejo se compone de VP1 y VP3, y carece de actividad de replicación (Fig. 4). A partir del precoreRI se ensambla el complejo coreRI que incluye a las proteínas VP1, VP2, VP3, NSP2 y NSP5, este complejo tiene actividad de replicación (Fig. 4, 5). Por último, la adición de VP6 al coreRI da origen al complejo VP6RI, a partir del cual se originan las DLP's (revisado en Estes & Cohen, 1989, Lopez, 2003). La última etapa de la morfogénesis viral se lleva a cabo en el RE, en un proceso en el que las DLP's geman de los viroplasmos al RE, cuya membrana está 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. Luego por un mecanismo desconocido las DLPs pierden la envoltura de lípidos y a la proteína NSP4, pero retienen a las proteínas VP4 y VP7 que se ensamblan formando la tercera capa proteica, dando lugar a los virus maduros compuestos de tres capas (TLP's) (Fig. 6). Experimentos donde se ha utilizado la técnica de RNAi, han mostrado que la pérdida de la membrana es un proceso dependiente de VP7 (Lopez et al., 2005a), además se ha observado que VP4 no se requiere para el ensamble de VP7 durante la morfogénesis, ya que en su ausencia se forman partículas de tres capas, pero sin espículas ("spikeless" TLPs); sin embargo, esta proteína es esencial para la infectividad del virus (Dector et al., 2002); Finalmente los viriones se acumulan en el lumen del RE hasta ser liberados por la lisis celular (Fig. 6) (Lopez, 2003, Lopez et al., 2005a). Recientemente se ha observado que en los viroplasmos se sintetiza RNAm, lo cual sugiere que una proporción de VP6RI o de DLP's (formadas en los viroplasmos) podrían generar un segundo ciclo de transcripción (Lopez et al., 2005b, Silvestri et al., 2004).

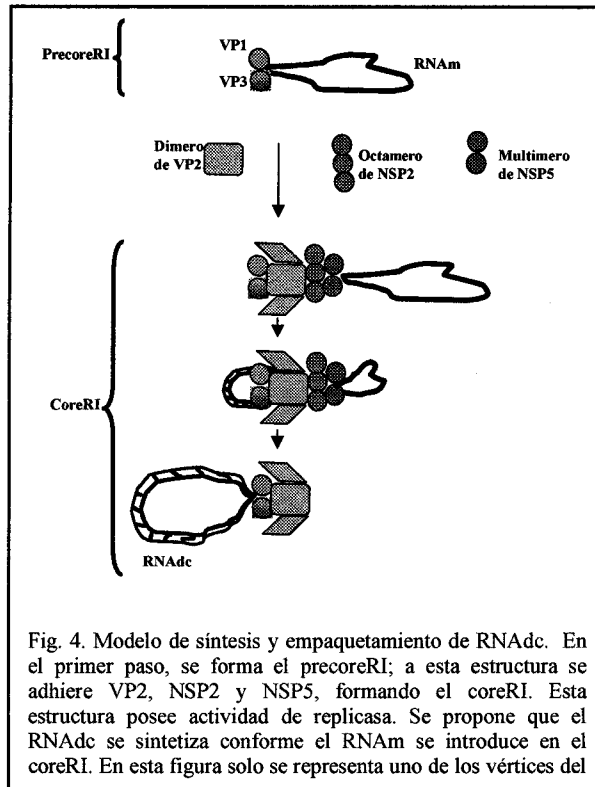


Fig. 4. Modelo de síntesis y empaquetamiento de RNAdc. En el primer paso, se forma el precoreRI; a esta estructura se adhiere VP2, NSP2 y NSP5, formando el coreRI. Esta estructura posee actividad de replicasa. Se propone que el RNAdc se sintetiza conforme el RNAm se introduce en el coreRI. En esta figura solo se representa uno de los vértices del

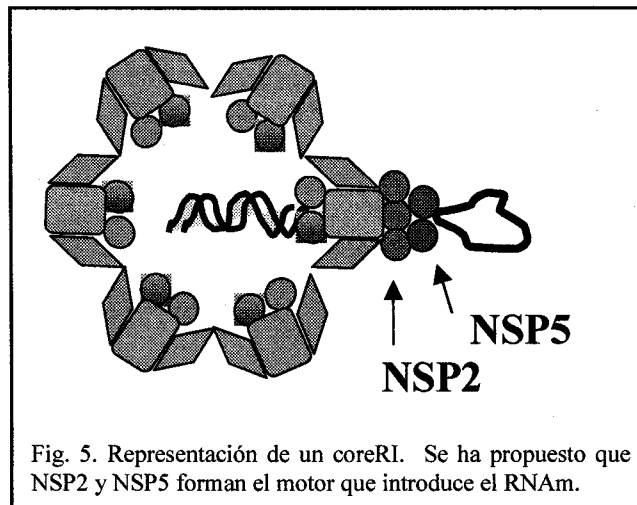


Fig. 5. Representación de un coreRI. Se ha propuesto que NSP2 y NSP5 forman el motor que introduce el RNAm.

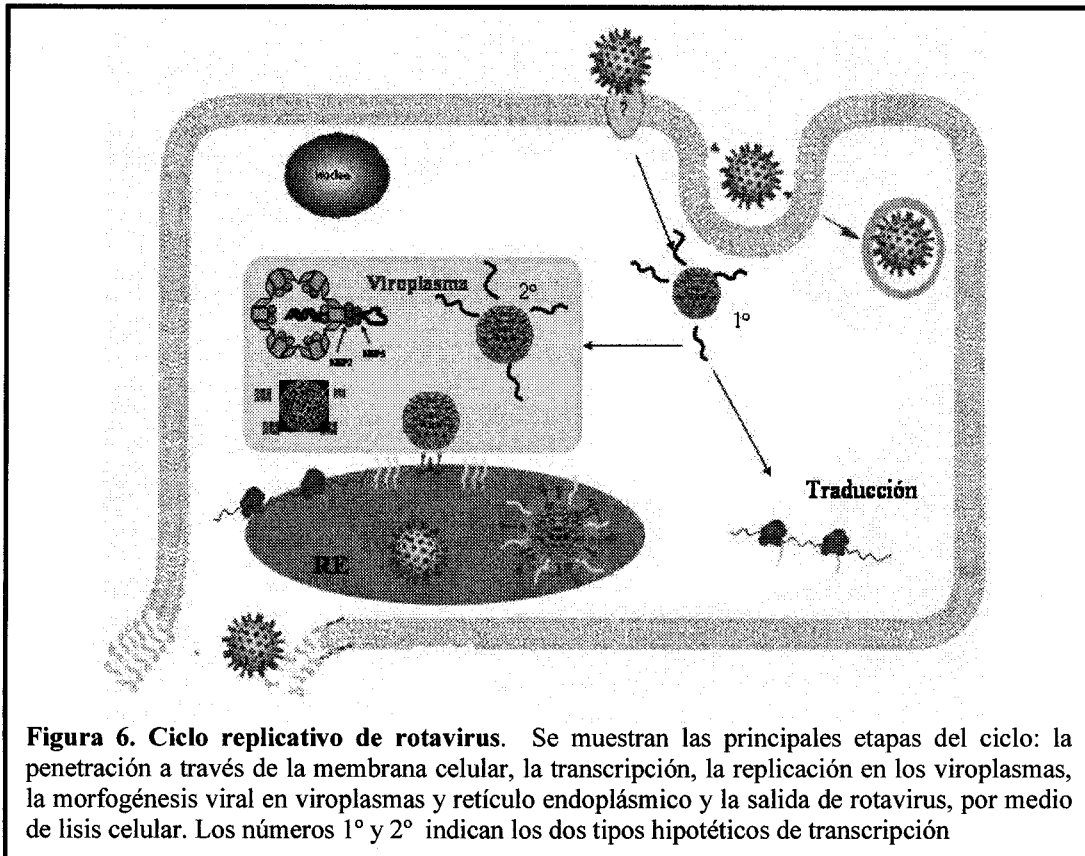


Figura 6. Ciclo replicativo de rotavirus. Se muestran las principales etapas del ciclo: la penetración a través de la membrana celular, la transcripción, la replicación en los viroplasmata, la morfogénesis viral en viroplasmata y retículo endoplásmico y la salida de rotavirus, por medio de lisis celular. Los números 1° y 2° indican los dos tipos hipotéticos de transcripción

Inhibición de genes por RNAi

Actualmente no se dispone de un sistema de genética reversa que permita mutagenizar y evaluar la función de cada una de las proteínas de rotavirus. Una alternativa es el uso de un mecanismo propio de los organismos eucariontes denominado "interferencia por RNA" o "RNAi". Este mecanismo se basa en el silenciamiento de genes a nivel postranscripcional y se activa por RNAdc dirigiendo la degradación del RNAm blanco, el cual es idéntico en secuencia al RNAdc (Bass, 2001, Baulcombe, 2001).

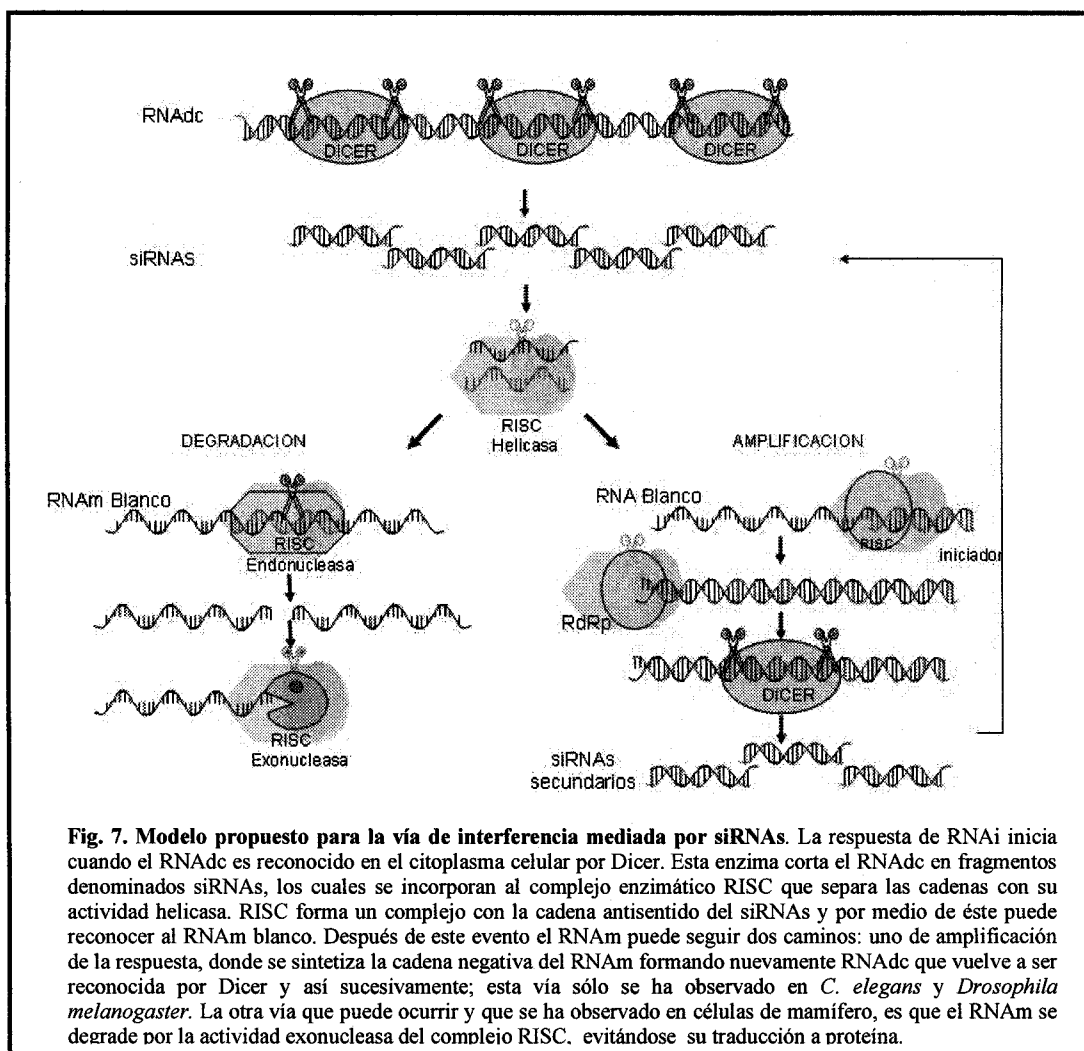
Esta tecnología tiene la ventaja de ser un mecanismo biológico conservado en eucariontes. Al parecer el mecanismo de RNAi media la resistencia a los ácidos nucleicos parásitos, tanto endógenos como exógenos, y regula la expresión de genes que codifican para proteínas, particularmente durante el desarrollo y diferenciación de los tejidos de un organismo (Bass, 2001, Baulcombe, 2001, Caplen, 2002, Caplen et al., 2001, Gitlin et al., 2002, Hannon, 2002).

El proceso de RNAi inducido por RNAdc se lleva a cabo en tres pasos; en el primero, los RNAdc son procesados por una RNasa de tipo III llamada Dicer (Fig. 7), esta enzima corta el RNAdc en piezas de aproximadamente 21-23 pb (llamados RNAs pequeños interferentes o siRNA) con 2 nucleótidos sobresalientes en el extremo 3'. En la segunda etapa los siRNAs se unen a un complejo enzimático, identificado en *Drosophila* y llamado RISC (por sus siglas en inglés: RNA Induced Silencing Complex). En este complejo los siRNAs son convertidos a RNA de cadena sencilla por acción de una helicasa. El tercer paso es el reconocimiento del RNA blanco de cadena sencilla mediante la cadena negativa de los siRNAs que sirve como guía por acoplamiento de bases. El RNAm blanco apareado con el

siRNA puede seguir una etapa de amplificación de la señal interferente, en la cual el RNAm blanco es convertido a RNAdc mediante una RNAPol, que usa la cadena negativa del siRNA como iniciador para sintetizar la cadena complementaria, este RNAdc es cortado nuevamente por Dicer para generar siRNAs secundarios; sin embargo, esta etapa no parece ocurrir en mamíferos; la otra opción es que el RNA blanco en el duplex siRNA-RNAm se degrade por acción de otras RNAasas del complejo RISC diferentes a Dicer, evitando la traducción de la proteína blanco (Figura 7) (Bass, 2001, Baulcombe, 2001, Caplen, 2002, Caplen et al., 2001, Donze & Picard, 2002, Gitlin et al., 2002, Hannon, 2002, Mattion et al., 1991).

La tecnología de RNAi representa una herramienta potencial en el entendimiento de los mecanismos moleculares de cada etapa de la infección viral (entrada, transcripción, replicación y morfogénesis), lo que puede ayudar al desarrollo de estrategias antivirales profilácticas y terapéuticas. Sin embargo, no se pueden introducir RNAdc directamente en las células de mamífero, ya que se desencadenan respuestas inespecíficas que dañan la traducción celular y eventualmente la célula muere por apoptosis. Se sabe que un RNAdc mayor de 30 pb desencadena tales respuestas e induce apoptosis por dos vías: en la primera, el RNAdc activa una proteína cinasa llamada PKR que a su vez fosforila e inactiva el factor de inicio de la traducción eIF2 α , dando como resultado la represión de la síntesis de proteínas; en la segunda vía, el RNAdc activa indirectamente a la ribonucleasa L, la cual degrada todos los RNAm celulares de manera inespecífica. Se ha observado que el mecanismo de RNAi puede ser inducido por fragmentos de RNAdc de 21-26 pb sin inducir la respuesta inespecífica (Bass, 2001, Baulcombe, 2001, Caplen, 2002, Caplen et al., 2001, Donze & Picard, 2002, Gitlin et al., 2002, Hannon, 2002, Mattion et al., 1991).

Los siRNAs pueden sintetizarse químicamente e introducirse en células de mamífero por microinyección, transfección, o por alimentación de organismos con *Escherichia coli* que expresan siRNAs. Los siRNAs también se pueden producir a partir de un precursor de RNAs expresado en el núcleo celular (Devroe & Silver, 2002). Estos métodos han sido utilizados para el silenciamiento de genes propios del organismo.



Antecedentes

Recientemente, en nuestro laboratorio se utilizó el siRNA (siNSP5) dirigido contra la secuencia del gen 11 (que expresa NSP5) para inhibir específicamente la expresión de NSP5 y analizar su función en el contexto de una infección viral. Esto permitió observar que en ausencia de NSP5 se reduce la síntesis de todas las proteínas virales, disminuye la producción de progenie viral y la síntesis de RNAdc. El tamaño y número de viroplasmos es menor en ausencia de NSP5 y ocurren cambios en la distribución normal de VP4, VP6 y NSP4. Cuando se purifican partículas virales por gradientes de CsCl, se observa que en células tratadas con un siNSP5 se producen menos TLPs y DLPs que células controles, y en la parte superior del gradiente aparecen dos bandas que no se observan en células controles, estas bandas podrían ser intermediarios de replicación o partículas mal ensambladas (López et al., 2004, Rojas, 2004a).

Es posible que la disminución de viroplasmos cuando se interfiere NSP5 afecte el segundo ciclo de transcripción; esto explicaría la reducción de la síntesis de proteínas y RNAdc. Por otro lado, es probable que NSP5 participe directa o indirectamente en la maquinaria de replicación, traducción y ensamble de partículas virales. (López et al., 2004, Rojas, 2004a)

El silenciamiento de NSP5 demostró que esta proteína tiene un papel esencial en la traducción y replicación viral; sin embargo, estos datos generan nuevas interrogantes: 1) ¿En ausencia de NSP5 se afecta la transcripción primaria y/o secundaria?, 2) ¿A que corresponden las bandas extras producidas en gradientes de CsCl cuando se interfiere la expresión de NSP5?, 3) ¿Cuál es la importancia de la fosforilación de NSP5 en el ciclo replicativo de rotavirus?.

Justificación

La infección por rotavirus representa un gran problema de salud pública, ya que es la causa principal de gastroenteritis en niños menores de tres años, sobre todo en países en vías de desarrollo donde se presentan elevadas tasas de mortalidad. No se dispone de un sistema de genética reversa que permita mutagenizar y evaluar la función de cada una de las proteínas de rotavirus. Una alternativa es el uso de RNAi. Este sistema puede proveer información acerca de los mecanismos de replicación viral, y ayudar al desarrollo de estrategias antivirales. El estudio de los virus también puede ayudar a comprender mejor el funcionamiento de procesos celulares, ya que los virus explotan eficientemente estos sistemas.

Hipótesis:

En nuestro laboratorio previamente utilizamos el sistema de RNAi para silenciar la expresión de NSP5 en células infectadas con rotavirus. El silenciamiento de NSP5 condujo a una reducción en la síntesis de proteínas y RNAdc, y a la producción dos bandas aún no caracterizadas (purificadas en gradientes de CsCl). Nuestra hipótesis es que en ausencia de NSP5 la transcripción de los RNAm de rotavirus es afectada, esto explicaría la reducción en la síntesis de proteínas y RNAdc. Además sugerimos que las bandas no caracterizadas pueden representar intermediarios de replicación, probablemente cuando la proteína NSP5 es ausente, la poca proteína viral que se produce se acumula preferencialmente en estas bandas, ya que en condiciones normales no se logran ver. En nuestro laboratorio se ha sugerido que rotavirus tiene dos etapas de transcripción, una que depende de las partículas que infectan a las células y una segunda etapa que proviene de las partículas generadas de novo en el interior de la célula; sin embargo, esto no ha sido demostrado. Nosotros sugerimos que un segundo ciclo de transcripción debería reflejarse en un aumento repentino en la transcripción de los RNAm virales y en consecuencia de su traducción. Adicionalmente sugerimos que la función de NSP5 en el ciclo replicativo de rotavirus puede ser regulada por su grado de fosforilación.

Objetivo:

- Estudiar el papel de NSP5 en la replicación de rotavirus.

Objetivos particulares:

- Caracterizar las partículas virales que se producen en gradientes de CsCl cuando se interfiere la expresión del gen 11 de rotavirus, que codifica para NSP5.
- Analizar la transcripción primaria y secundaria en células tratadas con el siNSP5 e infectadas con rotavirus.
- Estudiar el papel que desempeña la fosforilación de NSP5 en: la traducción, replicación, formación de viroplasmos y producción de partículas virales.
- Realizar la complementación fenotípica de NSP5.

Materiales y Métodos

Células y Virus

La línea celular MA104, derivada de células epiteliales de riñón del mono *Rhesus*, fue crecida en medio mínimo esencial de Eagle (MEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino. Los rotavirus RRV y SA11 (cepas de simio) fueron suministradas por H.B. Greenberg, Universidad de Stanford, Palo Alto CA.

siRNAs y plásmidos

El siRNA correspondiente a los nucleótidos 95-115 del gen 11 de rotavirus (siNSP5) y el siControl (un siRNA irrelevante, que no afecta el ciclo replicativo de rotavirus) se diseñaron de acuerdo a las recomendaciones de la compañía Dharmacon Research Inc (Lafayette, Co., EUA) y del grupo de Thomas Tuschl (Fig. 8).

```
UCU AUU GGU AGG AGU GAA CTT siNSP5
TT AGA UAA CCA UCC UCA CUU C
```

Fig. 8. Diseño del siNSP5. Se muestra el duplex de siRNAs. Las timinas sobresalientes del extremo 3' de la hebra antisentido del siRNA, son deoxinucleótidos de timidina y complementarios al RNAm blanco.

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 y se reconstituyen con agua libre de RNAsas.

Para construir los vectores pTRE-NSP5 y pTRE-NSP5-mut, los plásmidos pcDNA-NSP5 y pcDNA-NSP5-mut fueron digeridos con la enzima SmaI, el fragmento obtenido fue clonado en el sitio EcoRV del vector pTRE-2-Hyg. Para obtener los plásmidos pTRE-HA-NSP5 y pTRE-HA-NSP5-mut, el gen 11 fue amplificado a partir de los plásmidos pcDNA-NSP5 y pcDNA-mut. Se utilizaron los oligos 5'-AAAGCGACGCGTTGATGTCTCTCAGTATTGACGTGAC Y CTCCCGTTTTGTGACC GCGGCCGCGGTCTG-3' los cuales permiten la adición de los sitios de restricción Mlu I y Not I respectivamente. El fragmento obtenido fue digerido con las enzimas Mlu I y Not I y clonado en los sitios Mlu I y Not I del vector pTRE-2hyg2-HA.

Transfecciones

Células MA104 confluentes se transfectaron con 100 μ l de una solución con 40 μ g/ml de lipofectamina (Invitrogen) y 600 pmol/ml de siControl o el siNSP5 en MEM sin suero (MEM s/s). La mezcla se adicionó durante 8 h a 37 $^{\circ}$ C, al cabo de este tiempo las células se lavan dos veces con MEM (s/s) y se dejan incubando en MEM s/s por 48 h antes de la infección con rotavirus. Células MA104 crecidas sobre cubre objetos y con una confluencia aproximada del 60%, fueron transfectadas con 100 μ l de Lipofectamina 2000 (40 μ g/ml) y diferentes cantidades de los plásmidos.

Determinación del rendimiento viral

Para determinar el título viral de los lisados virales usados en este trabajo, células MA104 se infectan con una multiplicidad de infección (moi) (# de partículas virales por célula) de 3, 12 hrs post infección (h.p.i), las células se cosechan congelando 3 veces. Los lisados se activan con tripsina (20 mg/ml) durante 30 minutos a 37° C, a partir de ellos se hacen diluciones seriadas y con ellos se infectan monocapas de células MA104 en placas de 96 pozos por 1 h a 37° C. Los pozos se lavan 2 veces con 100 µl de MEM s/s y se dejan 14-16 h a 37° C en incubadora con 5% de CO₂. Después de la incubación se retira el medio de cultivo, y las células se fijan con 100 µl de acetona al 80% durante 30 minutos, transcurrido este tiempo las monocapas celulares se lavan dos veces con 200 µl de PBS 1X. Las células fijadas se incuban con el suero policlonal anti-YM (C75) generado en el laboratorio en una dilución de 1:750 (v/v) en PBS 1X por una hora a 37° C. Después las células se lavan dos veces con 100 µl de PBS 1X, y se incuban 1 h con proteína A-peroxidasa (Amersham-Pharmacia Biotech) en una dilución de 1:3000 (v/v) en PBS 1X. Para revelar las células infectadas, se usa 3-amino-9-etil-carbazole (SIGMA CHEMICALS) como sustrato para la peroxidasa, lo cual produce un precipitado en color café. La determinación del título viral se lleva a cabo contando las células teñidas (focos infecciosos) en cada dilución. Se utiliza la siguiente fórmula: No. De Focos X dilución X 4.5 X 20 (Factor de volumen de 50 µl) = unidades formadoras de focos infecciosos por mililitro (uff/ml)

Marcaje metabólico

Para el análisis de proteínas, células MA104 se crecen en placas de 48 pozos, se transfectan con los siRNAs, se infectan con rotavirus con una moi de 3, media hora antes de los tiempos de cosecha indicados, las proteínas virales se marcan con 50 μ Ci/ml de metionina ³⁵S (Dupont NEN). Para el análisis de RNA viral, células MA104 se crecen en placas de 12 pozos, 2 h.p.i., la síntesis de RNA celular se bloquea con actinomicina (10 μ g/ml). El RNA viral se marca con ortofosfato (³²P) μ Ci/ml. A las 12 h.p.i. las células se lisan con Trizol. El RNA viral se extrae y se analiza por geles de poliacrilamida.

Western blot

Células MA104 previamente transfectadas con siRNAs o tratadas con inhibidores de CK1 se infectan con el rotavirus RRV o SA11 a una moi de 2 durante 1 h, después de este tiempo las células se lavan con MEM s/s. Después de 8 h.p.i. las células se lisan con el amortiguador de carga (50 mM Tris-Cl pH 6.8, 2% SDS, 0.1% azul de bromofenol, 10% glicerol, 1% β -mercaptoetanol). Los lisados se hierven por 5 minutos antes de separar las proteínas por PAGE-SDS 14%. Las proteínas se transfirieren a una membrana inmovilon-NC (Millipore), durante 1 h a 130 mA, en amortiguador CAPS (10 mM, pH 11) empleando el módulo de transferencia Mini Trans-Blot (BioRad). La membrana se bloquea con 5% de leche descremada (Carnation) en PBS 1X-0.1% tween 20 durante 1 h. La membrana se incuba con los anticuerpos primarios diluidos en PBS-0.1% tween 20. Se utilizaron los sueros policlonales α NSP5, α TLPs y α vimentina en una dilución 1:1000 (v/v). La incubación

se realiza por toda la noche a 4° C o 1 h a temperatura ambiente, luego se hacen 3 lavados con PSB 1X-0.1% tween 20 por 10 minutos y 3 tres lavados de 10 minutos con PBS 1X. Como anticuerpo secundario se utiliza el suero α conejo conjugado A-peroxidasa (NEN) diluido 1:10,000 (v/v) en PBS 1X-0.1% tween 20. Al finalizar la incubación se hacen 3 lavados con PSB 1X-0.1% tween 20 por 10 minutos y 3 tres lavados de 10 minutos con PBS 1X. Finalmente las proteínas se detectan con el sustrato para peroxidasa western lighting, según las instrucciones del proveedor (Perkin-Elmer) exponiendo la película hipersensible X-Omat (Kodak).

Inmunofluorescencia

Células MA104 se crecen sobre un cubreobjetos en cajas C-48, una vez que las células alcanzan la confluencia necesaria, se infectan con RRV a una moi de 3. Después de la infección las células son tratadas con H7 a las concentraciones indicadas. A las 8 h postinfección (p.i) se procede la inmunofluorescencia como sigue: la monocapa celular se lava con PBS 1X y se fija 20 minutos con 300 μ l de una solución 2% de para-formaldehído (SIGMA CHEMICALS) en PSB 1X, al finalizar el tiempo de fijación las células se lavan 4 veces con 300 μ l de PBS 1X-NH₄Cl 50 mM. El siguiente paso es permeabilizar las células 15 minutos con 200 μ l del amortiguador de permeabilización (PBS 1X, 1% BSA, 0.5% tritón X-100, NH₄Cl 50 mM). Para detectar las proteínas, las células se incuban con el o los anticuerpos primarios por una hora a temperatura ambiente en 100 μ l de amortiguador (PBS 1X, 1% BSA, NH₄Cl 50 mM). NSP5 se detecta con el suero policlonal α NSP5 en dilución 1:400 (v/v); además se utiliza el compuesto DAPI para teñir núcleos , al finalizar

la incubación se hacen 4 lavados de 5 minutos cada uno con 500 μ l de PBS 1X-NH₄Cl 5 mM. Como anticuerpos secundarios se utiliza anti-conejo acoplado a Alexa 488 y anti-ratón acoplado a Alexa 568 (Molecular Probes), al finalizar la incubación se hacen 4 lavados de 5 minutos cada uno con 500 μ l de PBS 1X-NH₄C 5 mM. El cubre objetos con las células hacia abajo se monta sobre un porta objetos con 3 μ l de glicerol 70%, fijando sus bordes con barniz de uñas. Finalmente las preparaciones se visualizan en un microscopio confocal MRC-600 (Bio-Rad) con ayuda del programa CoMOS MPL-1000; se utilizan las líneas de excitación amarilla (λ 568 nm) y azul (λ 488 nm) y los filtros K1 o K2.

Extracción de RNA viral

Para este ensayo se utilizan 200 μ l de un lisado viral que se mezcla con 40 μ l del amortiguador disruptor 5X (Tris Base 2.6 M, EDTA 750 mM, SDS 450 mM, NaCl 6.8 M, β -mercaptoetanol 1.8 M). A esta mezcla se agrega 200 μ l de fenol saturado y se agita con un vortex durante 2 minutos, pasado este tiempo se adiciona 200 μ l de cloroformo, y se agita con un vortex durante 2 minutos. Esta mezcla se centrifuga 5 minutos a 12,000 rpm; se recupera el sobrenadante y se agrega 2.5 volúmenes de etanol absoluto y 50 μ l de acetato de sodio, se deja precipitar toda la noche. Finalmente se agita con un vortex y se centrifuga 15 minutos a 12,000 rpm, se decanta el sobrenadante y la pastilla se resuspende en 30 μ l del amortiguador de carga (Tris-Cl 50 mM pH 6.8, Azul de bromofenol 0.1%, glicerol 10%). Las muestras se analizan en geles nativos de acrilamida, la electroforesis se realiza durante 4 h a 150 V, el gel se coloca 1 h en una solución fijadora (28.7% etanol, 0.3% ácido acético), después se coloca 30 minutos en una solución de nitrato de plata 11 mM y se lava dos veces con

agua destilada. Las bandas de RNAdc se observan después de agregar la solución reveladora (NaOH 700 mM, 0.8 % formaldehído). Una vez que se hace visible el patrón de bandas se retira la solución reveladora y se detiene la reacción con ácido acético al 10%.

RT-PCR

La cantidad de RNAm y RNAdc correspondiente al gen 10, se cuantifico por PCR en tiempo real. Para este ensayo, células MA104 se crecen en el formato de 12 pozos y se transfectan con los siRNAs correspondientes, se infectan con el rotavirus RRV. A los tiempos indicados las células se lisan con Trizol y el RNA total se extrae de acuerdo a las instrucciones de la compañía. El DNAdc se sintetiza a partir de 0.1 a 1 ng de RNA total usando el oligo 5'-TCCTGGAATGGCGTATTTTC-3', que corresponde a los nucleótidos 122–141 del gen 10 de RRV. Posteriormente el DNA se amplifica utilizando el oligo 5'-GAGCAATCTTCATGGTTGGAA-3' que corresponde a los nucleótidos 173–193 del gen 10 de RRV, este ensayo se realiza en presencia de una mezcla maestra de "SybrGreen" (Applied Biosystems). Para detectar el RNA se utilizó el programa de detección ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems). Los resultados se normalizan con respecto a los niveles del RNAm de GAPDH detectado en cada muestra.

Gradientes

Células MA104 crecidas en frascos de 25 cm² (F25), transfectadas con los siRNAs e infectadas con el rotavirus RRV se lisan por congelación a las 24 h.p.i. Los lisados se centrifugan a 30,000 rpm durante 1 h, la pastilla se resuspende en 750 µl del amortiguador TNC (Tris pH 7.5 10 mM, NaCl 140 mM, CaCl 10 mM), se mezcla con un

vortex y se adiciona 750 μ l de Freón (cloro, difluoro metano). La mezcla se agita con un vortex, después se centrifuga a 6,000 rpm durante 5 minutos, se recupera la fase acuosa (virus). Se adiciona nuevamente 750 μ l de TNC a la fase orgánica y se repite la extracción tres veces más. Al total extraído se adiciona 1.8 g, 2 g ó 2.2 g de CsCl y se afora a 5 ml con TNC; esta mezcla se ultracentrifuga a 36, 000 rpm durante 18 hrs. Las bandas opalescentes se visualizan bajo la luz de una lámpara y se toman fotografías con una cámara digital. Las partículas en el gradiente se recolectan picando cada una de las bandas con ayuda de una jeringa de 1 ml. Para eliminar la proteína y el RNA viral soluble, el volumen obtenido se coloca en la parte superior de un colchón de sacarosa al 40% y es centrifugado durante 1 h a 40, 000 rpm. El pastilla se resuspende en 200 μ l de agua destilada.

Análisis de las bandas observadas en gradientes de CsCl

Antes de separar las proteínas por SDS-PAGE, a 50 μ l de cada banda del gradiente, se adiciona 50 μ l de cloroformo, 150 μ l de agua destilada y se mezcla con un vortex, después se centrifuga 2 minutos a 13,000 rpm. La parte superior se retira y a la fase inferior se añaden 200 μ l de metanol, esta mezcla se centrifuga dos minutos a 13,000 rpm, después de esto se decanta el sobrenadante. La pastilla se resuspende en 50 μ l de amortiguador de carga 1X (50 mM Tris-Cl pH 6.8, 2% SDS, 0.1% azul de bromofenol, 10% glicerol, 1% β -mercaptoetanol) y se hierve durante 5 minutos, las proteínas son separadas por SDS-PAGE 11%. El gel se fija 1 h en metanol 50% y ácido acético 12%, después se lava tres veces con etanol al 30% por espacios de 20

minutos, pasado este tiempo el gel se coloca en una solución de tiosulfato de sodio (0.2 g/L) durante 1 minuto antes de incubarse 20 minutos en nitrato de plata (6 g/L) y 74 μ l de formaldehído al 37%. Después se lava dos veces con agua destilada y se agrega la solución reveladora (Carbonato de sodio 560 mM, 50 μ l de formaldehído 37% /L, y 600 μ l de tiosulfato de sodio del paso anterior). Una vez que se hace visible el patrón de bandas, se lava el gel dos veces con agua y la reacción de revelado se detiene con metanol al 50% y ácido acético al 12%.

Las alícuotas de cada fracción o banda se desalan con la resina sephadex G-25 (Sigma chemicals) estéril lavadas con PBS 1X y se empacan en una jeringa de 1 ml. La resina se seca y se le pasan 20 μ l de PBS, ambas mediante una centrifugación de 20 segundos a 1000 rpm. Finalmente se colocan 100 μ l de las fracciones en la columna y se centrifuga de la misma manera para obtener una solución de virus libre de CsCl. El RNAm y el RNAdc se extraen con Trizol (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones de la compañía.

RESULTADOS

Caracterización de partículas virales producidas cuando se interfiere la expresión de NSP5

Las partículas TLP's, DLP's y las cápsides vacías (llamadas aquí B1 y B2) tienen una densidad de 1.36, 1.38, 1.31 y 1.315 respectivamente. Estas partículas pueden purificarse en gradientes de CsCl (2.61 M). En estos gradientes las partículas virales se observan como bandas separadas de acuerdo a su densidad (Fig. 9).

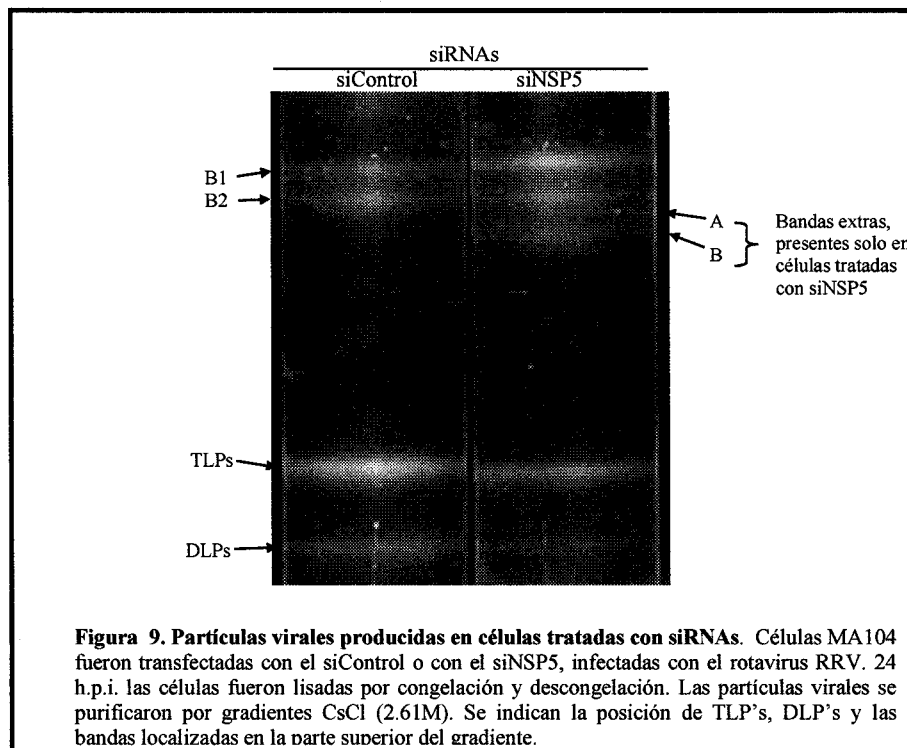


Figura 9. Partículas virales producidas en células tratadas con siRNAs. Células MA104 fueron transfectadas con el siControl o con el siNSP5, infectadas con el rotavirus RRV. 24 h.p.i. las células fueron lisadas por congelación y descongelación. Las partículas virales se purificaron por gradientes CsCl (2.61M). Se indican la posición de TLP's, DLP's y las bandas localizadas en la parte superior del gradiente.

En gradientes de CsCl obtenidos a partir de células tratadas con el siControl e infectadas con el rotavirus RRV se observan dos bandas en la parte inferior, una corresponde a TLP's y la otra a DLP's y en la parte superior se observan dos bandas, caracterizadas previamente como cápsides vacías por carecer de RNAdc (Fig. 9) (Brussow et al., 1990). En gradientes de CsCl obtenidos a partir de células infectadas con RRV y tratadas con el siNSP5 (López et al., 2004) la producción de TLP's y DLP's se reduce y además de las bandas características, se producen dos bandas extras en la parte superior del gradiente a las cuales llamamos bandas A y B (Fig. 9). Para un análisis detallado de estas bandas, se ensayaron diferentes concentraciones de CsCl con el fin de lograr una mejor separación de cada banda. Evaluamos dos concentraciones de CsCl, cuando partimos de 2.13 M no mejoró la separación de las bandas superiores y las DLP's quedaron en el fondo del gradiente. Cuando utilizamos 2.37 M de CsCl las bandas en la parte superior del gradiente se separan mejor y se pueden observar las TLP's y DLP's, lo cual es útil para un análisis más completo (Fig. 10).

Para analizar la composición proteica de cada banda, las proteínas sintetizadas en células tratadas con el siControl o el siNSP5 fueron marcadas con metionina (^{35}S), las partículas virales producidas en estas células fueron separadas en gradientes de CsCl 2.37 M. Cada banda observada fue aislada. Para eliminar la proteína soluble y obtener únicamente las proteínas que pudieran estar formando algún tipo de cápside, las bandas aisladas fueron sedimentadas en un colchón de sacarosa al 40%. Finalmente, las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE y observadas por autorradiografía (Fig. 11).

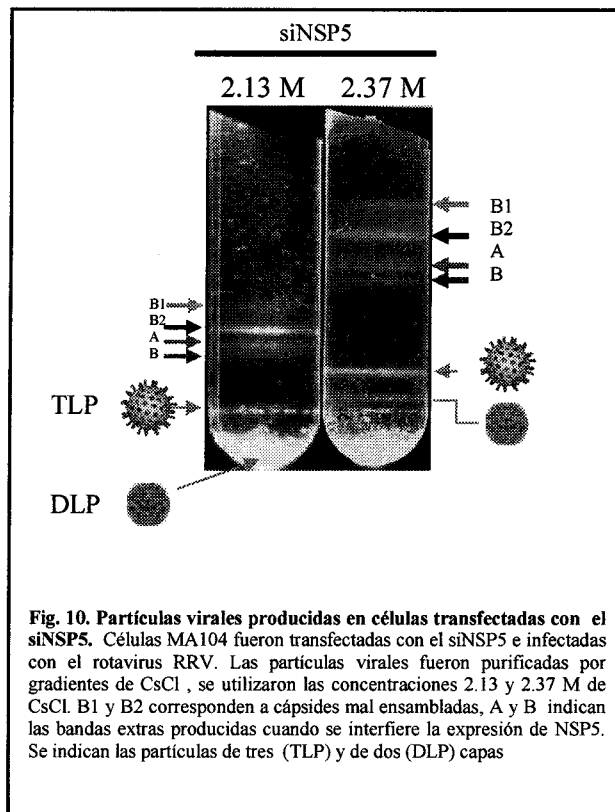
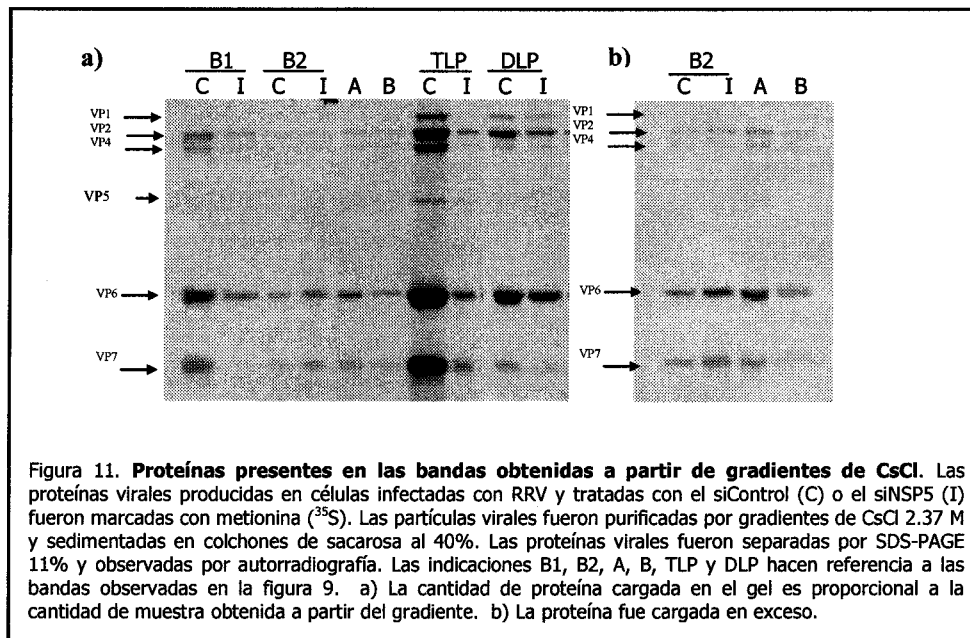


Fig. 10. Partículas virales producidas en células transfectadas con el siNSP5. Células MA104 fueron transfectadas con el siNSP5 e infectadas con el rotavirus RRV. Las partículas virales fueron purificadas por gradientes de CsCl, se utilizaron las concentraciones 2.13 y 2.37 M de CsCl. B1 y B2 corresponden a cápsides mal ensambladas, A y B indican las bandas extras producidas cuando se interfiere la expresión de NSP5. Se indican las partículas de tres (TLP) y de dos (DLP) capas

Las bandas correspondientes a las DLP's contienen las proteínas VP1, VP2, VP3 y VP6; las bandas que corresponden a TLP's contienen las proteínas VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 y VP7. La concentración de proteínas en las TLP's y DLP's es mayor en los gradientes obtenidos a partir de células tratadas con un siControl (Fig. 11a líneas c). Las bandas reportadas como cápsides vacías y las bandas A y B tienen todas las proteínas de las TLP's, con excepción de VP1 (Fig. 11 a y b). Las bandas B1, B2, A y B forman una pastilla cuando se colocan en un colchón de sacarosa, esto y el hecho de que las bandas B1 y B2 vistas por microscopia electrónica corresponden a un tipo de partícula, sugiere que las bandas A y B observadas cuando se interfiere NSP5 también corresponden a algún tipo de partícula.



Los gradientes de CsCl permiten el bandeo de partículas virales debido a su densidad, que radica en su proporción de RNA/proteína, y difícilmente bandea la proteína o el RNA soluble. Lo que sugiere que las bandas B1, B2, A y B podrían contener algún tipo de RNA. Para probar esta hipótesis el RNA viral de cadena positiva y negativa se midió por PCR en tiempo real (RT-PCR). El contenido de RNAm, se obtiene por la diferencia entre cadena positiva y negativa. Como se esperaba TLP's y DLP's contienen predominantemente RNAdc, y la cantidad de RNAdc es mayor en los controles, congruente con los datos mostrados en la figura 11 (Fig. 12 panel c). Las bandas B1 y B2 han sido reportadas como cápsides vacías (Brüssow, 1990); sin embargo, encontramos que hay asociado a ellas pequeñas cantidades de RNAm y RNAdc, lo mismo ocurre con las bandas A y B (Fig. 12 panel a y b). La cantidad de RNAm y RNAdc es considerablemente menor en las bandas B1, B2, A y B que en las bandas de TLP's o DLP's; sin embargo la parte media del

gradiente fue utilizada como control negativo, y en este caso no hubo amplificación de RNAm o RNAdc, sugiriendo que la cantidad de RNA detectada en las bandas B1, B2, A y B es específica.

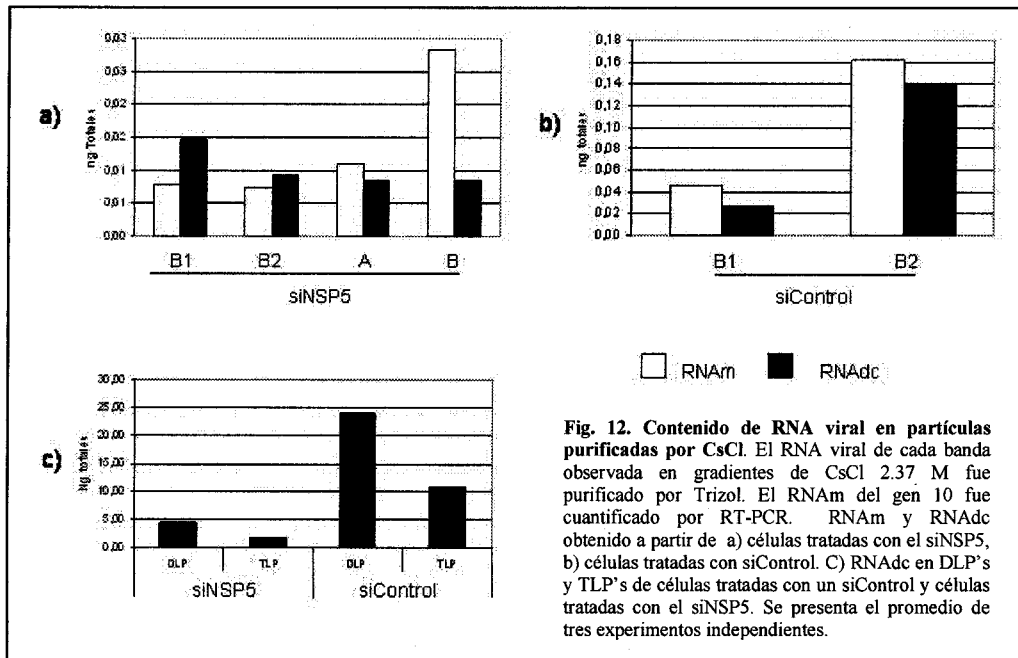


Fig. 12. Contenido de RNA viral en partículas purificadas por CsCl. El RNA viral de cada banda observada en gradientes de CsCl 2.37 M fue purificado por Trizol. El RNAm del gen 10 fue cuantificado por RT-PCR. RNAm y RNAdc obtenido a partir de a) células tratadas con el siN5P5, b) células tratadas con siControl. C) RNAdc en DLP's y TLP's de células tratadas con un siControl y células tratadas con el siN5P5. Se presenta el promedio de tres experimentos independientes.

Síntesis de RNAm viral en células tratadas con el siNSP5

Recientemente demostramos que en células donde la expresión de NSP5 fue silenciada, se reduce la síntesis de proteínas y la producción de RNAdc; sin embargo, no se evaluó el efecto sobre la producción de RNAm. Para evaluar si la ausencia de NSP5 afecta la transcripción viral, el RNAm producido en células transfectadas con los siRNAs e infectadas con rotavirus se marco con ortofosfato (^{32}P) y se analizó por PAGE (Fig. 13). En células transfectadas con un siRNA irrelevante se observan los 11 segmentos de RNAm y los 11 segmentos de RNAdc. Los 22 segmentos se observan en células tratadas con el siNSP5; sin embargo, la cantidad de RNA es menor (Fig. 13). Estos datos sugieren que en ausencia de NSP5 se reduce la transcripción del genoma de rotavirus.

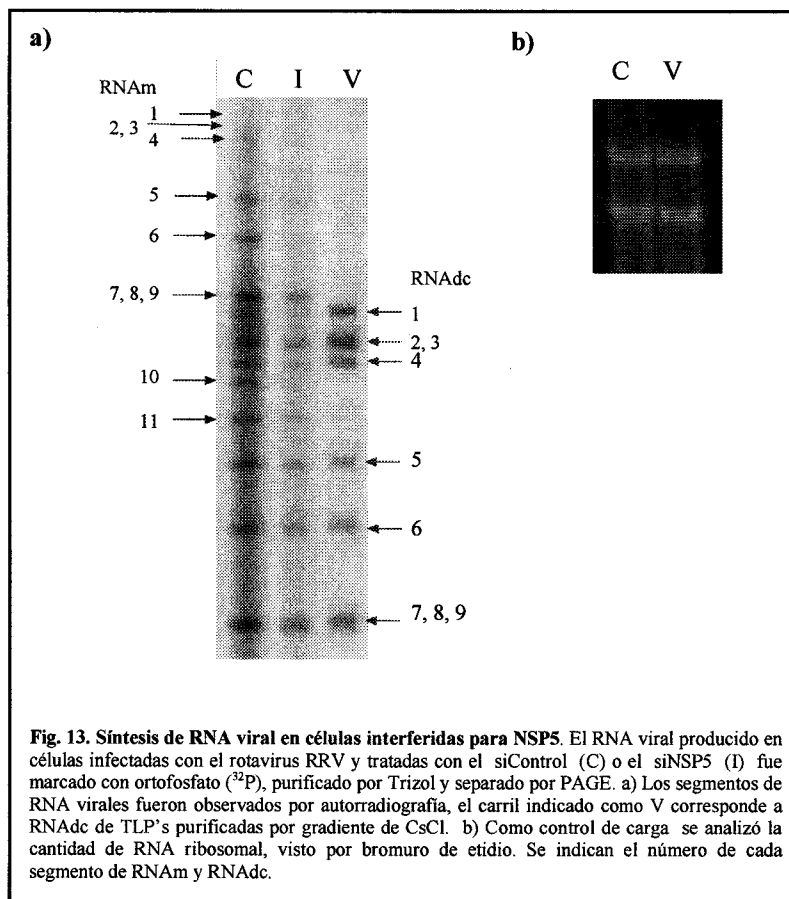


Fig. 13. Síntesis de RNA viral en células interferidas para NSP5. El RNA viral producido en células infectadas con el rotavirus RRV y tratadas con el siControl (C) o el siNSP5 (I) fue marcado con ortofosfato (^{32}P), purificado por Trizol y separado por PAGE. a) Los segmentos de RNA virales fueron observados por autorradiografía, el carril indicado como V corresponde a RNAdc de TLP's purificadas por gradiente de CsCl. b) Como control de carga se analizó la cantidad de RNA ribosomal, visto por bromuro de etidio. Se indican el número de cada segmento de RNAm y RNAdc.

Cabe destacar que la proporción, entre el segmento 11 y los otros segmentos se mantiene en células tratadas con el siNSP5, a pesar de que el siRNA esta dirigido específicamente para este gen. Estos resultados concuerdan con la hipótesis de que cierta proporción de RNAm que sirve para la síntesis de RNAdc está protegida de la degradación por RNAi (Dector, 2002, Silvestri, 2004).

El análisis de RNAm y proteína viral revelan la existencia de un segundo ciclo de transcripción

Después de que rotavirus entra en la célula inicia un primer ciclo de transcripción. Varias líneas de investigación sugieren la existencia de un segundo ciclo de transcripción, que podría ser derivado de las partículas formadas de novo en el interior de los viroplasmos de la célula infectada. Si rotavirus solo tiene un primer ciclo de transcripción, la velocidad de incorporación de metionina (^{35}S) en proteínas y la acumulación de RNA viral tendrían un aumento lineal durante el ciclo de replicación. En el caso de existir un segundo ciclo de transcripción, se observarían dos diferentes velocidades de acumulación en la síntesis de proteínas y RNAm. Para probar esta hipótesis se realizó una cinética de síntesis de proteínas. En células controles podemos observar que la incorporación de ^{35}S en proteínas virales inicia desde la primera hora post infección y se mantiene similar por 3 horas (Fig. 14 líneas c), a las cuatro horas inicia un aumento en la incorporación de metionina (^{35}S) en las proteínas virales (Fig. 14, líneas c). El análisis densitométrico revela que este aumento es de al menos 2.5 veces a las 4 h.p.i. y de 3 veces a las 10 h.p.i. (Fig. 15, barras claras).

Para analizar directamente la existencia de un segundo ciclo de transcripción, el RNAm del gen 10 se cuantificó por RT-PCR en tiempo real. De acuerdo a los datos de acumulación de metionina (^{35}S), se eligieron dos tiempos que teóricamente son previos al segundo ciclo y dos tiempos después del segundo ciclo de transcripción. Congruente con los datos anteriores, podemos observar que a las 6 h.p.i la producción de RNAm aumenta 18 veces con respecto a las 3 h.p.i. (Fig. 16, barras claras), el mismo comportamiento fue observado al analizar otros genes de rotavirus (Ayala-Bretón, C, manuscrito en preparación). Estos resultados sugieren la existencia de un segundo ciclo de transcripción, que inicia aproximadamente a las 4 h.p.i.

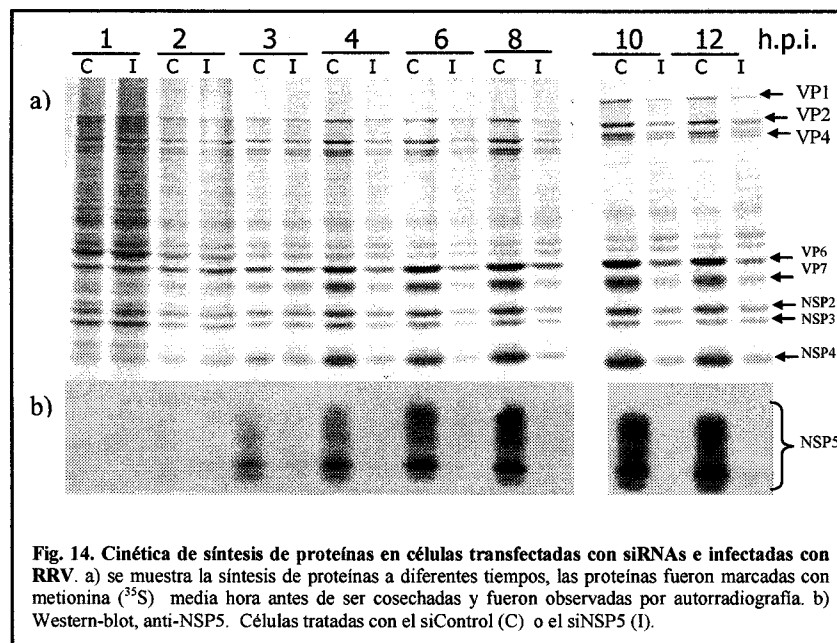
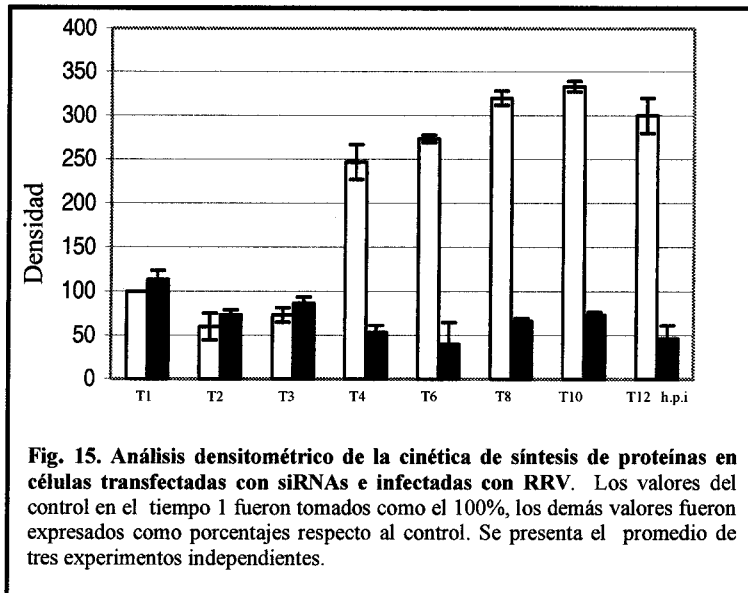


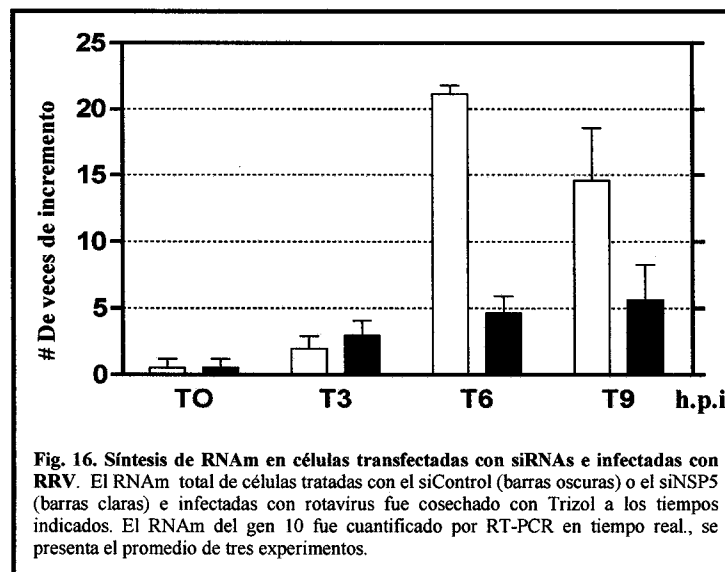
Fig. 14. Cinética de síntesis de proteínas en células transfectadas con siRNAs e infectadas con RRV. a) se muestra la síntesis de proteínas a diferentes tiempos, las proteínas fueron marcadas con metionina (^{35}S) media hora antes de ser cosechadas y fueron observadas por autorradiografía. b) Western-blot, anti-NSP5. Células tratadas con el siControl (C) o el siNSP5 (I).



La inhibición de NSP5 resulta en la inhibición del segundo ciclo de transcripción.

La inhibición de NSP5 da como resultado una reducción en la síntesis de proteínas, RNAdc y RNAm viral, además de la reducción en la formación de viroplasmata. Los viroplasmata representan el sitio potencial en donde se lleva a cabo la transcripción secundaria. Ya que NSP5 es importante en la formación de estas estructuras, nosotros proponemos que la inhibición de la expresión de NSP5 puede afectar el segundo ciclo de transcripción. Si esto es cierto la expresión de NSP5 se vería reducida, desde las primeras horas de infección en células transfectadas con el siNSP5, pero no la síntesis de otras proteínas virales. Sin embargo, la falta de NSP5 evitaría la formación de viroplasmata, lo cual provocaría la inhibición del segundo ciclo de transcripción, de tal forma que la inhibición de NSP5 tendría un efecto sobre la síntesis de proteínas y RNAm a tiempos tardíos. Para confirmar

esta hipótesis se analizó la cinética de incorporación de metionina (^{35}S) en proteínas virales sintetizadas en células MA104, interferidas para NSP5 e infectadas con RRV. En este experimento se observó que la acumulación de metionina (^{35}S) en proteínas virales se mantiene constante; mientras que en los controles hay un claro aumento a las 4 h.p.i. (Fig. 14, líneas I). El análisis densitométrico revela que la síntesis de proteínas en células interferidas para NSP5 (excepto NSP5) permanece constante a lo largo de la infección (Fig. 15, barras oscuras). El análisis por western-blot muestra que la síntesis de NSP5 es inhibida desde las primeras horas de infección (Fig. 14, panel b). En congruencia con los datos anteriores (Fig. 16 barras oscuras), se observó que la inhibición de NSP5 solo afecta la síntesis de RNAm a tiempos tardíos; ya que no hay diferencia significativa en la síntesis de RNAm entre células controles y células tratadas con el siNSP5 a las 0 y 3 h.p.i. Estos resultados apoyan la existencia de un primer ciclo de transcripción independiente de NSP5 y un segundo ciclo de transcripción que es afectado cuando se interfiere la expresión de NSP5.



Inhibición de la fosforilación de NSP5

La proteína NSP5 tiene dos tipos de modificaciones post-transcripcionales: la O-glicosilación y la fosforilación; sin embargo se desconoce el papel que tienen estas modificaciones en la función de NSP5. En nuestro laboratorio previamente se realizaron ensayos de fosforilación *in vitro*, los cuales demostraron que existen cinasas celulares que fosforilan a NSP5. Se utilizaron algunos inhibidores de cinasas para bloquear la fosforilación de NSP5 *in vitro* (Tabla 1), y solo el inhibidor de serina/treonina cinasas, H7 fue capaz de inhibir la fosforilación de NSP5 (Torres-Vega, 2000). Recientemente, se utilizó una enzima recombinante de CKI la cual fue capaz de fosforilar a NSP5 *in vitro* (Eichwald, 2004). Estos datos sugieren que CKI puede ser la cinasa que fosforila a NSP5; sin embargo, esto no ha sido demostrado *in vivo* y no se conoce la relevancia de la fosforilación de NSP5 en el ciclo replicativo de rotavirus. Actualmente, existen en el mercado inhibidores específicos de CKI entre ellos el 3-[(2,4,6-trimethoxyphenyl)methylidene]-indolin-2-one (IC261) y el (4-[4-(2,3-dihydrobenzo[1,4]dioxin-6-yl)-5-pyridin-2-yl-1H-imidazol-2-yl]benzamide) (D4476), estos compuestos han sido probados *in vivo e in vitro* y han demostrado inhibir eficientemente a CKI (Mashhoon, 2000, Rena, 2004).

Inhibidor	CaMK	CKI	CKII	MLCK	PKA	PKC	PKG
Estaurosporina	0.2	-	-	0.013	0.007	0.007	0.085
Esfingosina	-	-	-	-	-	2.8	-
Calfostina C	-	-	-	>5	>50	0.05	>25
H89	29.7	38.3	137	28.3	0.048	31.7	0.48
H7	-	100	-	97	3	6	5.8

Tabla 1. Inhibidores de cinasas CaMK, cinasa dependiente de Ca²⁺/Calmodulina; CKI, caseína cinasa I; MLCK, cinasa de la cadena ligera de miosina; PKA, proteína cinasa dependiente de AMPc; PKC, proteína cinasa C; PKG, proteína cinasa dependiente de GMPC. Se muestran las concentraciones a la que se inhibe el 50% (IC) de la cinasa indicada en concentración μ M.

Para conocer más acerca de la importancia que tiene la fosforilación de NSP5 en el ciclo replicativo de rotavirus, células MA104 infectadas con la cepa de rotavirus SA11 fueron tratadas con diferentes concentraciones de los inhibidores H7, IC261 y D4476. Para evitar un efecto de los inhibidores sobre la entrada de rotavirus, éstos fueron colocados 1 h después de la infección (tiempo promedio en el que se da la entrada de rotavirus a la célula). El western-blot de NSP5 muestra que en células sin tratamiento se producen varias formas de NSP5, dos bandas bien definidas una de 26 y una de 28 Kda, y un barrido de 30-34 kda. Las forma de 28 y el barrido de 30-34 kda corresponden a las formas hiperfosforiladas de NSP5; mientras que la forma de 26 kda corresponde a la forma hipofosforilada (Fig. 17).

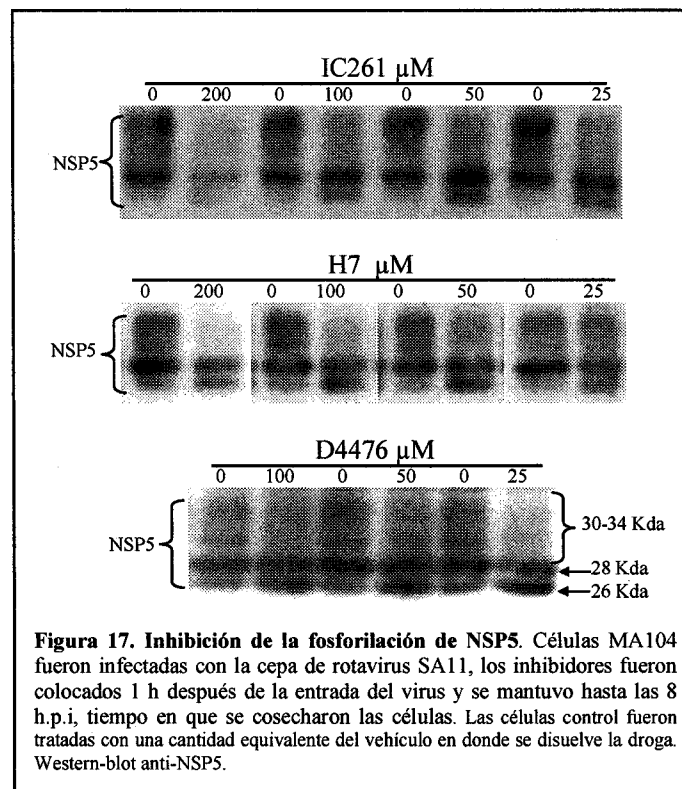
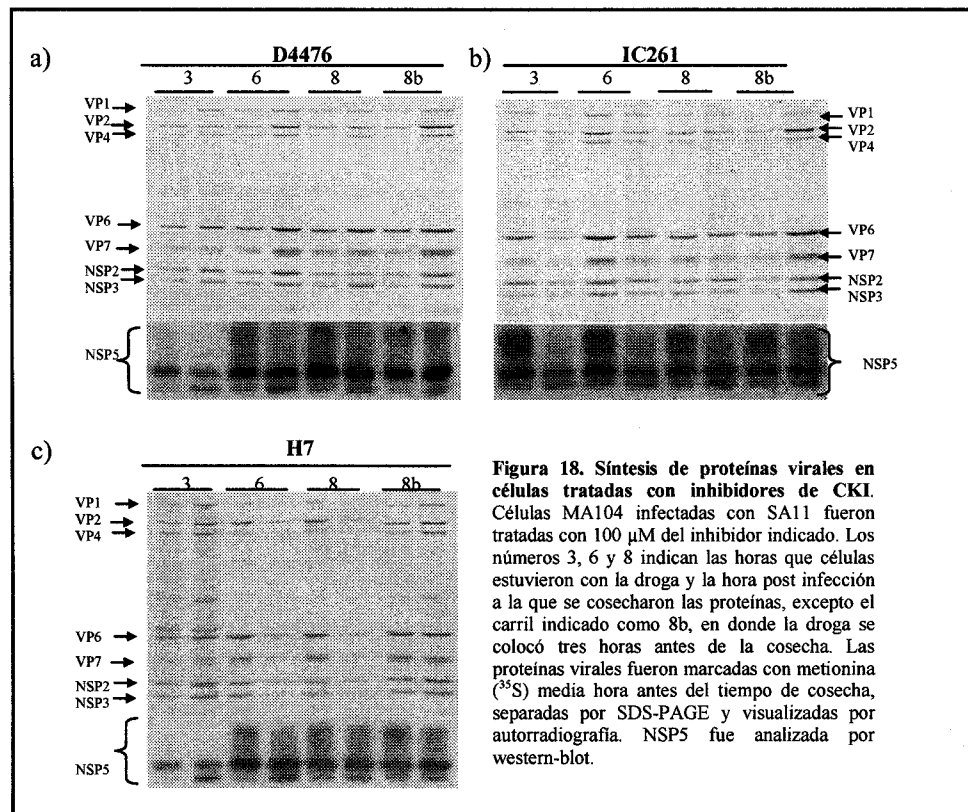


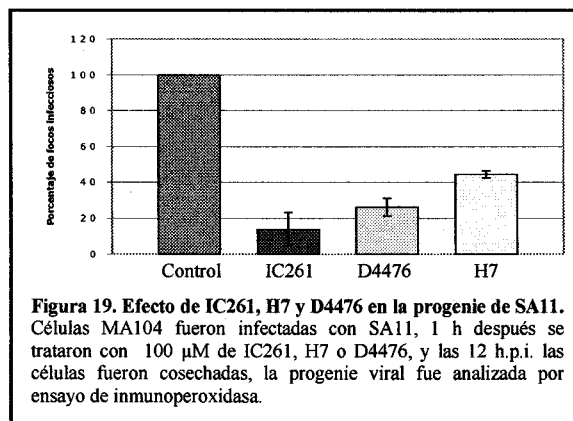
Figura 17. Inhibición de la fosforilación de NSP5. Células MA104 fueron infectadas con la cepa de rotavirus SA11, los inhibidores fueron colocados 1 h después de la entrada del virus y se mantuvo hasta las 8 h.p.i, tiempo en que se cosecharon las células. Las células control fueron tratadas con una cantidad equivalente del vehículo en donde se disuelve la droga. Western-blot anti-NSP5.

En células tratadas con cualquiera de los tres inhibidores se reduce la producción de las formas hiperfosforiladas de 30-34 Kda y se observa un ligero aumento en la forma de 26 Kda; sin embargo, aún a concentraciones elevadas de cualquiera de los inhibidores, no se logra abatir la fosforilación de NSP5 (Fig. 17), lo cual sugiere que CKI puede participar en la fosforilación de NSP5; pero además, deben participar otras cinasas. Dado que a bajas concentraciones de los inhibidores IC261, D4476 el efecto sobre la fosforilación de NSP5 no fue muy claro, en los siguientes experimentos se decidió utilizar la concentración de 100 μ M, esta concentración ha sido reportada previamente como la óptima para inhibir a CKI (Mashhoon, 2000, Rena, 2004), y también es la concentración recomendada para H7 (Chnaiderman, 2002).

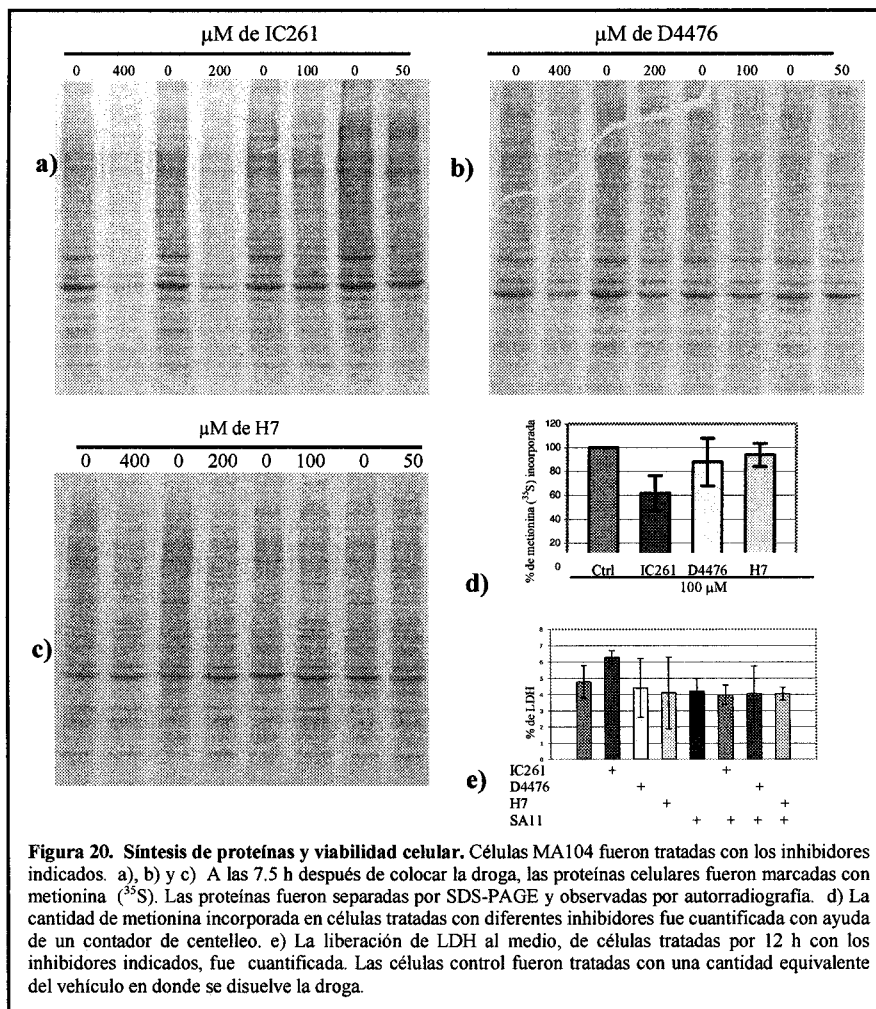


Analizamos el efecto de los inhibidores sobre el rendimiento viral y la incorporación de metionina (^{35}S) en las proteínas virales de células infectadas con SA11 (Fig. 18). En células tratadas con D4476, la incorporación de metionina (^{35}S) en proteínas virales incrementa con respecto al control (Fig. 18 panel a); este efecto se mantiene aún cuando la droga se coloca sólo durante 3 horas (Fig. 18a carril 3 y 8b). En el caso de células tratadas con H7, a las 3 horas post infección la incorporación de metionina ^{35}S en las proteínas virales incrementa con respecto al control; pero, se reduce a las 6 y 8 h.p.i. (Fig. 18c). Si la droga se coloca entre las 5 y 8 h.p.i. (Fig. 18c carril 8b) se observa un ligero incremento en la incorporación de metionina (^{35}S), similar al efecto que se observa a las 3 h.p.i. En células tratadas con IC261, la incorporación de metionina (^{35}S) en proteínas virales es menor a las 3, 6 y 8 h.p.i. (Fig. 18b); sin embargo cuando la droga se coloca de 5 a 8 h.p.i. la incorporación de metionina ^{35}S en proteínas virales se incrementa con respecto al control.

En cuanto a la producción de progenie viral IC261, D4476 y H7 reducen la producción de progenie viral en aproximadamente 87%, 74% y 66% respectivamente (Fig. 19). Estos datos no muestran ninguna correlación entre la disminución de progenie viral y la acumulación de metionina (^{35}S) en proteínas virales.



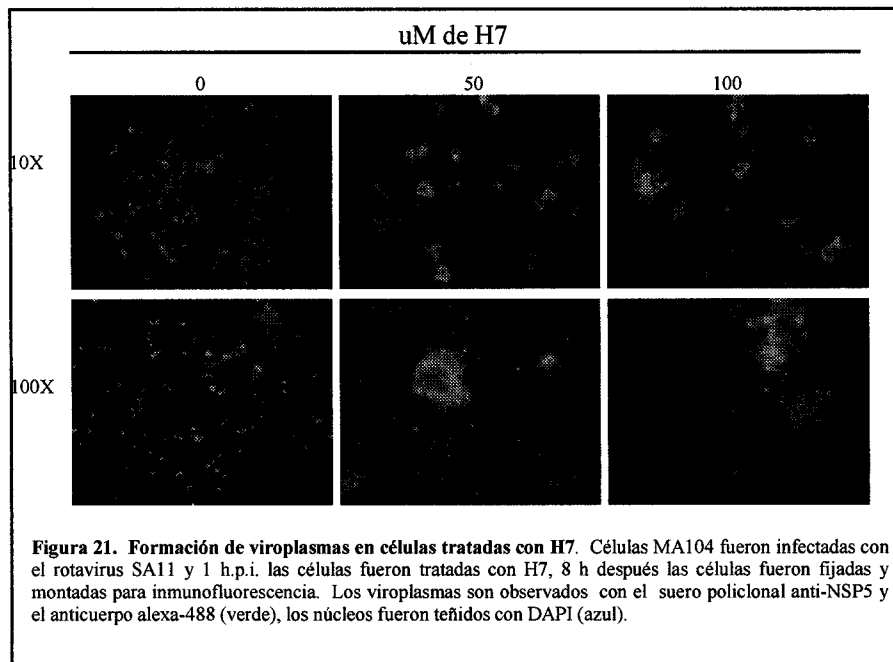
Para descartar que alguno de los inhibidores tuviera un efecto tóxico, se analizó la síntesis de proteínas celulares y la viabilidad de células tratadas con estos inhibidores (Fig. 20).



A la concentración de 100 μM solamente IC261 afecta la incorporación de metionina ^{35}S en proteínas celulares (Fig. 20 a, b y c). La cuantificación de metionina (^{35}S) incorporada indica una reducción del 38% en células tratadas con el IC261 (Fig. 20d). Sin embargo a concentraciones más elevadas de cualquiera de los inhibidores se reduce la incorporación

de metionina ^{35}S en las proteínas celulares. A la concentración de 100 μM ninguno de los inhibidores afecta la liberación de LDH al medio (Fig. 20e). Estos resultados comprueban que no hay un efecto tóxico de los inhibidores sobre la célula, aunque el IC261 afecta la síntesis general de proteínas.

Los resultados obtenidos con el inhibidor H7 (Fig. 18 c) son semejantes a los que se obtienen luego de inhibir la expresión de NSP5, lo cual sugiere que se inhibe el segundo ciclo y esto podría estar dado por la reducción en la formación de viroplasmata. Para evaluar el efecto de H7 sobre la formación de viroplasmata, células infectadas con el rotavirus SA11 y tratadas con H7 durante 8 horas fueron montadas para inmunofluorescencia. Los resultados muestran que a mayor concentración de H7 la formación de viroplasmata disminuye (Fig. 21). Esto podría explicar la disminución en la síntesis de proteínas virales que observamos cuando las células son tratadas con H7 durante 8 horas.



Apéndice

Complementación de la función de NSP5 en células tratadas con el siNSP5

En células MA104 transfectadas con el siNSP5 se inhibe específicamente la expresión de NSP5, la complementación de esta proteína puede lograrse expresando el gen 11 de rotavirus a partir de un plásmido (la región de este gen homóloga al siNSP5 debe ser diferente, para evitar su degradación por RISC (Fig. 22).

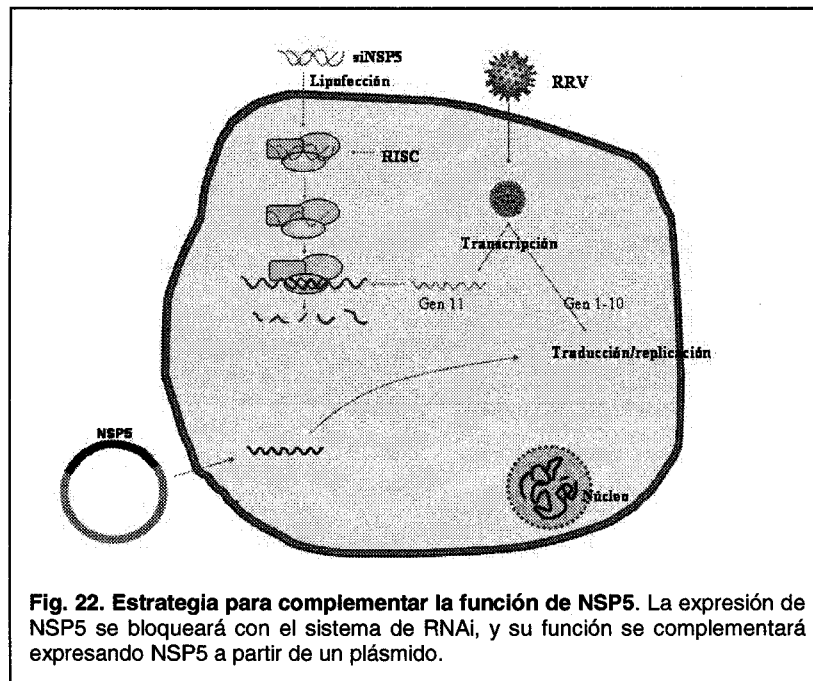
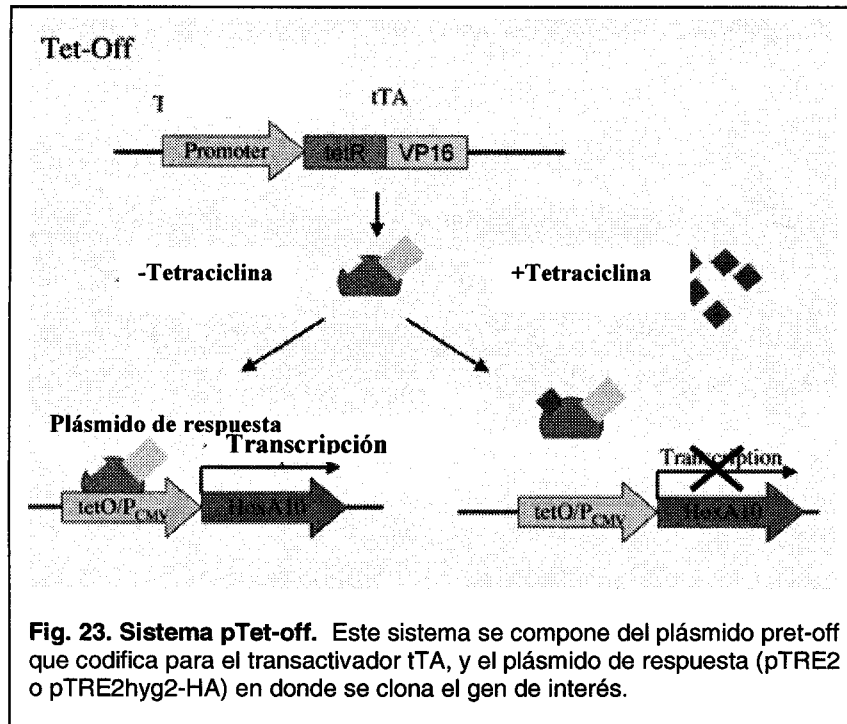


Fig. 22. Estrategia para complementar la función de NSP5. La expresión de NSP5 se bloqueará con el sistema de RNAi, y su función se complementará expresando NSP5 a partir de un plásmido.

Para realizar la complementación de la función de NSP5, en células transfectadas con el siNSP5 e infectadas con rotavirus, se contaba con los plásmidos pcDNA-NSP5 y pcDNA-NSP5-mut, éste último cuenta con una mutación en la región homóloga al siNSP5, lo cual sirve para escapar del sistema de RNAi. Con la mutación en el pcDNA-NSP5-mut se adicionó un sitio de corte para la enzima Bgl II, esto nos ayuda a reconocer el plásmido que tiene la secuencia de NSP5 silvestre de la que tiene la NSP5 mutante. Alternativamente se decidió utilizar el sistema Tet-off. Este sistema tiene dos

componentes, el primero es la proteína transactivadora controlada por tetraciclina (tTA). Esta proteína es codificada por el plásmido regulador pTet-off. El segundo componente es el plásmido de respuesta que expresa el gen de interés bajo el control de un elemento de respuesta a tetraciclina (TRE) (Fig. 23).



Para utilizar el sistema pTet-off se construyeron los plásmidos de respuesta pTRE-NSP5, pTRE-NSP5mut, pTRE-HA-NSP5 y pTRE-HA-NSP5-mut (Fig. 24). Los plásmidos pTRE-HA-NSP5 y pTRE-HA-NSP5-mut permiten la fusión de la proteína de NSP5 con un péptido de hemaglutinina (HA), en el futuro esto nos permitirá diferenciar la proteína NSP5 que proviene del plásmido de la que proviene del virus. Para verificar la orientación del inserto, los plásmidos pTRE-NSP5 y pTRE-NSP5-mut fueron digeridos con las enzimas KpnI y SmaI, y los plásmidos pTRE-HA-NSP5 y pTRE-HA-NSP5-mut con las

enzimas MluI, Not y EcoRV. Todos los plásmidos fueron cortados con la enzima Bgl II para checar la conservación de la mutación (Fig. 25).

Para evaluar si los plásmidos obtenidos expresan NSP5, éstos fueron transfectados en células MA104, 48 h después se realizaron ensayos de inmunofluorescencias para detectar la presencia de NSP5. Las células transfectadas con cualquiera de los plásmidos expresaron la proteína NSP5 (Fig. 26), el mejor resultado se obtuvo con los plásmidos pcDNA-NSP5 y pcDNA-NSP5-mut; sin embargo, el número de células que expresan NSP5 es insuficiente para realizar experimentos en donde se transfecte el plásmido, el siNSP5 y además se infecte con rotavirus. Debido a la información que este sistema nos puede brindar, es necesario establecer las condiciones que permitan aumentar el porcentaje de células transfectadas.

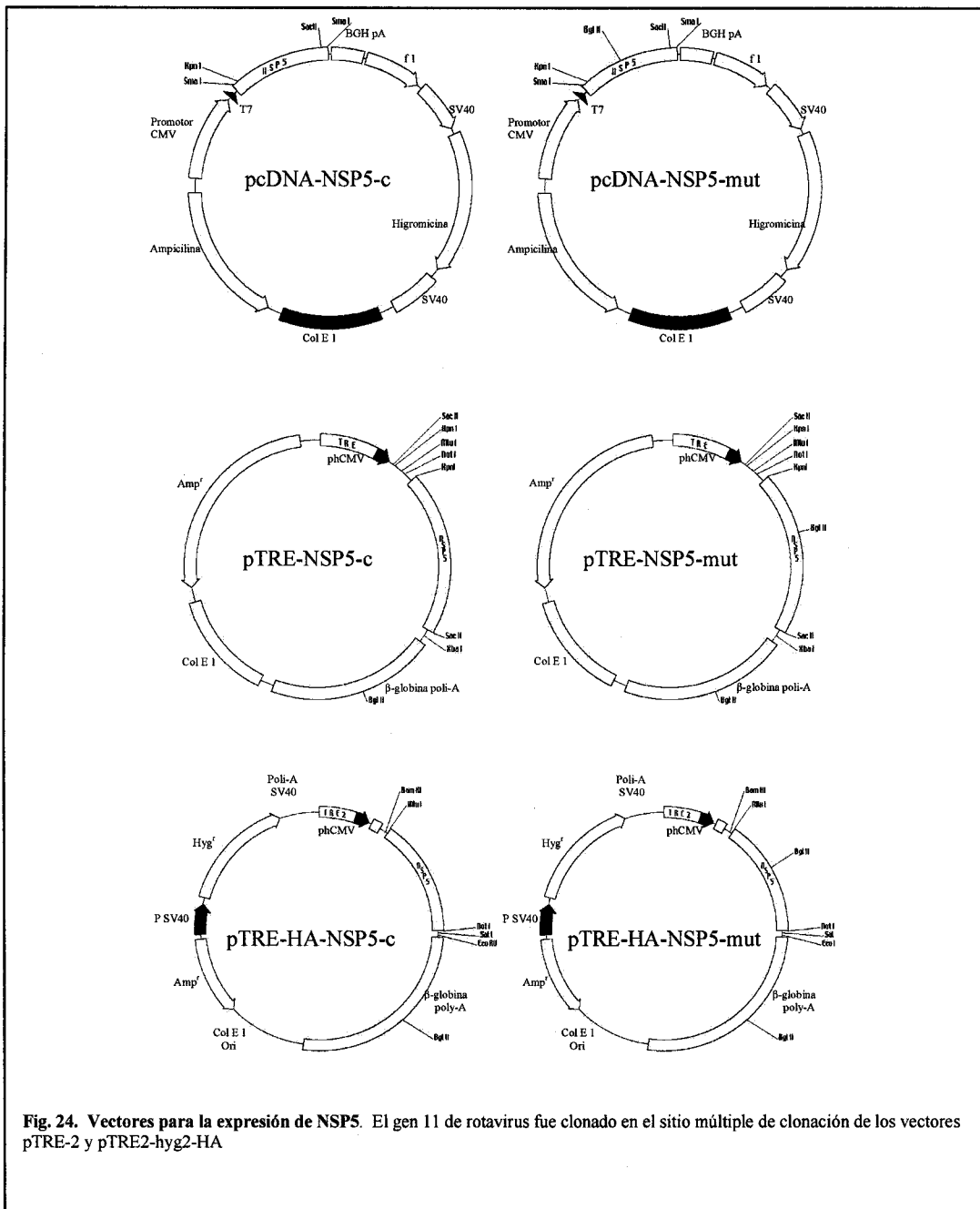
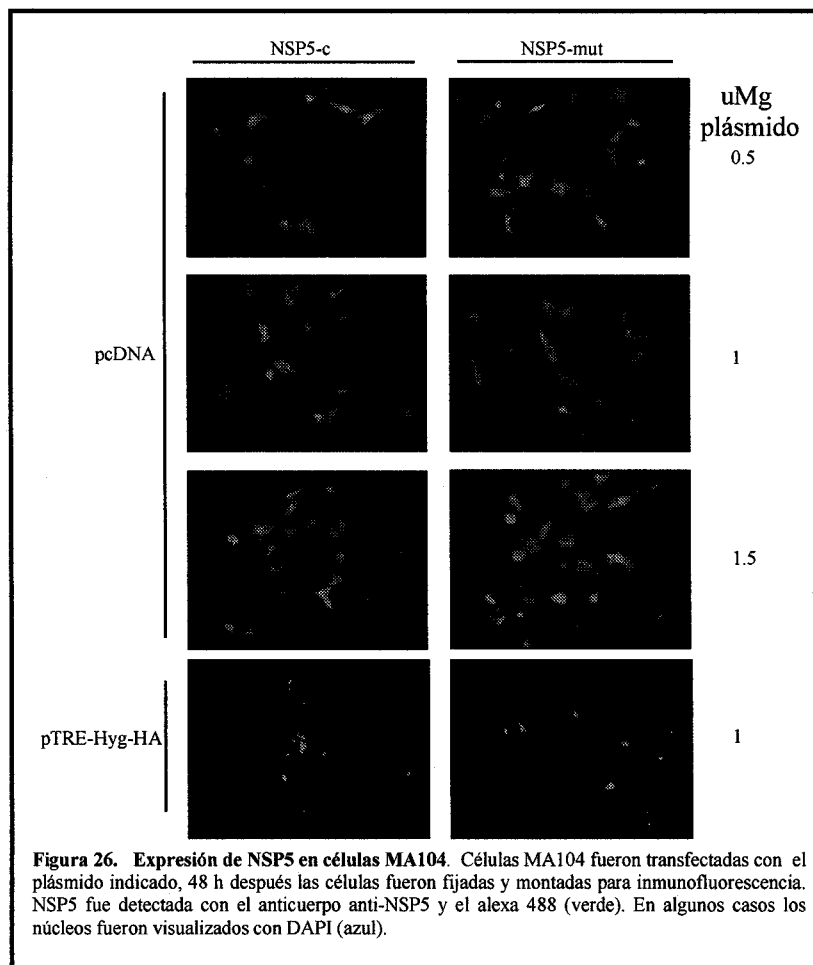
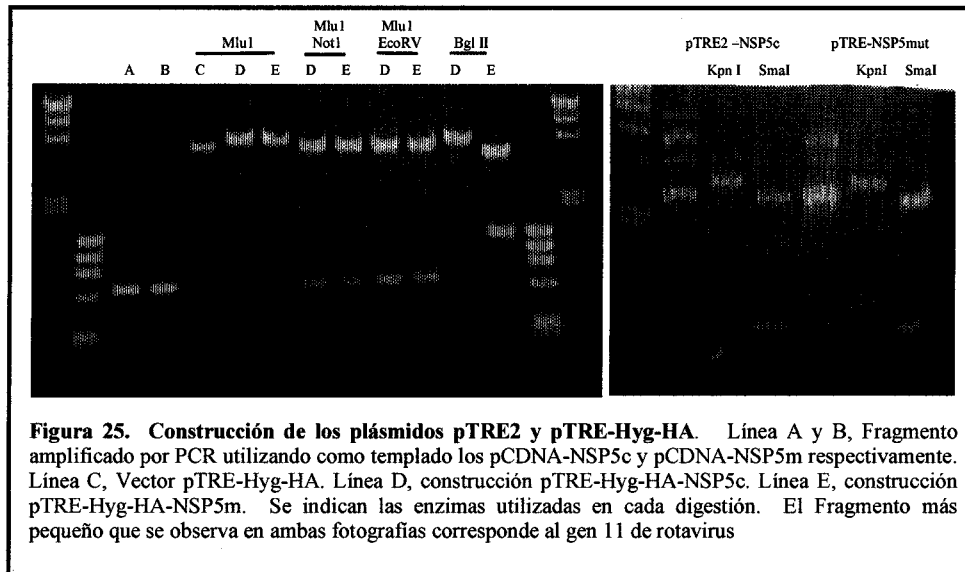


Fig. 24. Vectores para la expresión de NSP5. El gen 11 de rotavirus fue clonado en el sitio múltiple de clonación de los vectores pTRE-2 y pTRE2-hyg2-HA



Parte de los resultados obtenidos en esta tesis fueron publicados en el artículo:

Lopez, T., Rojas, M., Ayala-Breton, C., Lopez, S. & Arias, C. F. (2005b). Reduced expression of the rotavirus NSP5 gene has a pleiotropic effect on virus replication. J Gen Virol 86, 1609-17.

Reduced expression of the rotavirus NSP5 gene has a pleiotropic effect on virus replication

Tomás López, Margarito Rojas, Camilo Ayala-Bretón, Susana López and Carlos F. Arias

Correspondence
Carlos F. Arias
arias@ibtunam.mx

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

Rotavirus RRV gene 11 encodes two non-structural proteins, NSP5 and NSP6. NSP5 is a phosphorylated non-structural protein that binds single- and double-stranded RNA in a non-specific manner. Transient expression of this protein in uninfected cells has provided evidence for its participation in the formation of electron-dense cytoplasmic structures, known as viroplasm, which are thought to be key structures for the replication of the virus. NSP6 is a protein of unknown function that seems not to be essential for virus replication in cell culture. To study the function of NSP5 in the context of a viral infection, the expression of RRV gene 11 was silenced by RNA interference. Reduction in the synthesis of NSP5, as shown by immunoblot and immunofluorescence assays, correlated with a reduction in the number and size of viroplasm and with an altered intracellular distribution of other viroplasm-associated proteins. Silencing of gene 11 also resulted in a reduced synthesis of viral RNA(+) and double-stranded RNA and of all viral proteins, as well as in a decreased production of infectious virus. A similar phenotype was observed when the NSP5 coding gene of the lapine rotavirus strain Alabama was silenced. The fact that the NSP5 gene of rotavirus Alabama lacks the AUG initiator codon for a complete NSP6 protein, suggests that the described phenotype in gene 11-silenced cells is mostly due to the absence of NSP5. The data presented in this work suggest that NSP5 is a key protein during the replication cycle of rotaviruses.

Received 15 December 2004
Accepted 20 March 2005

INTRODUCTION

Rotaviruses, members of the family *Reoviridae*, have a genome composed of 11 segments of double-stranded RNA (dsRNA) that encodes six structural (VP1 to VP4, VP6 and VP7) and six non-structural (NSP1 to NSP6) proteins. The genome is enclosed in a capsid formed by three concentric layers of protein. The innermost layer, formed by VP2, contains the viral genome, the viral RNA polymerase VP1 and the capping enzyme VP3, which constitute the core of the virus. The addition of VP6 outside the VP2 layer produces double-layered particles (DLPs). The outermost layer, characteristic of triple-layered infectious particles (TLPs), is composed of two proteins, VP4 and VP7. The smooth external surface of the virus is formed by glycoprotein VP7, while 60 spike-like structures, formed by VP4, extend from the VP7 surface (Estes, 2001).

During the process of infection, the infecting TLP is adsorbed, penetrates the plasma membrane and is uncoated, loosing the two outer layer proteins and yielding a transcriptionally active DLP. The viral polymerase VP1 then

synthesizes the primary viral transcripts, which in addition to direct the synthesis of viral proteins, i.e. to function as mRNAs, are also believed to serve as RNA templates [RNA(+)] for the synthesis of the RNA-negative strands [RNA(-)] to form the genomic dsRNA (Estes, 2001; Patton *et al.*, 2003). Once a critical mass of viral proteins is synthesized, viral polypeptides NSP2, NSP5, NSP6, VP1, VP2, VP3 and VP6 accumulate in electron-dense cytoplasmic inclusions known as viroplasm (González *et al.*, 2000; Mattion *et al.*, 1991; Petrie *et al.*, 1984); these are key structures in the replication of rotavirus, where the synthesis of dsRNA and assembly of progeny DLPs are thought to take place (Estes, 2001).

The synthesis of RNA(-) has been proposed to occur concurrently with the packaging of RNA(+) into core replication intermediate (RI) particles (formed by VP1, VP2, VP3, and the non-structural proteins NSP2 and NSP5) in a highly coordinated manner, such that packaging and replication of RNA(+) lead to the formation of cores containing one copy of each of the 11 dsRNA genome segments (Patton *et al.*, 2003). Assembly of VP6 onto core RIs is then believed to lead to the production of transcriptionally active, dsRNA-containing DLPs (Estes, 2001). These particles are thought

Published online ahead of print on 31 March 2005 as DOI 10.1099/vir.0.80827-0.

to initiate a second round of transcription, which results in an amplified second wave of viral protein synthesis and assembly of DLPs, as has been shown for reovirus (Nibert & Schiff, 2001). Finally, the assembled DLPs bud through the membrane of the ER, acquiring during this process a transient membrane envelope, which is subsequently removed to yield mature infectious TLPs (Estes, 2001; Patton, 1995). Although the mechanism through which the transient membrane envelope is lost is not known, it has been recently shown to depend on VP7 (López *et al.*, 2005).

Rotavirus gene 11 encodes two proteins, NSP5 and NSP6. NSP5 is an O-glycosylated phosphoprotein (Afrikanova *et al.*, 1996; González & Burrone, 1991) present in several phosphorylated isoforms, which are thought to regulate their own phosphorylation (Afrikanova *et al.*, 1996; Blackhall *et al.*, 1998; Eichwald *et al.*, 2004; Eichwald *et al.*, 2002). NSP5 has been shown to interact in a sequence independent fashion with dsRNA and single-stranded (ss) RNA (Vende *et al.*, 2002), and it has been suggested that its phosphorylation state influences the rate of translation versus replication of the viral RNA (Chnaiderman *et al.*, 2002). When co-expressed with NSP2, in the absence of other viral proteins, NSP5 forms viroplasm-like structures (Fabbretti *et al.*, 1999), and more recently it was shown that amino-terminal deletion mutants of this protein can form viroplasm-like structures in the absence of NSP2 (Mohan *et al.*, 2003). NSP5 has also been shown to have a strong affinity to VP2, to an extent that it can outcompete VP6 in VLPs (Berois *et al.*, 2003). Despite the extensive characterization of the biochemical properties of NSP5, and the description of its viroplasm-forming properties by transient expression in uninfected cells, the role and relevance of this protein in the context of virus replication has not been determined.

NSP6 is a 92 aa protein of unknown function, encoded in a +1 alternative open reading frame (ORF) of rotavirus gene 11 (Mattion *et al.*, 1991). The NSP5 gene of many rotavirus strains has an ORF that could potentially encode NSP6; however, its synthesis has only been demonstrated in a few rotavirus strains (Mattion *et al.*, 1991; Torres-Vega *et al.*, 2000). In addition, the fact that some rotaviruses do not have this ORF suggests that NSP6 is not essential for virus replication (Mattion *et al.*, 1991; Taraporewala & Patton 2004; Torres-Vega *et al.*, 2000).

RNA interference (RNAi) is a process triggered by dsRNA that specifically silences the expression of the gene which shares sequence identity with the triggering dsRNA. The recent implementation of the RNAi technology to efficiently silence gene expression in mammalian cells has opened a tremendous opportunity for a rapid advance in the characterization of gene function (Elbashir *et al.*, 2001). This technology has also proven to be extremely useful to study the function of genes from plant and animal viruses, including rotaviruses (Arias *et al.*, 2004; Dector *et al.*, 2002; López *et al.*, 2005; Silvestri *et al.*, 2004).

To evaluate directly the role of NSP5 in the context of the replication of rotaviruses in infected cells, we silenced the expression of rotavirus RRV gene 11 by RNAi. We found that reduced amounts of NSP5 correlated with the inhibition of genomic dsRNA and viral protein synthesis, as well as with a marked reduction in the production of infectious viral progeny. These data indicate an essential role of NSP5 in the replication of rotaviruses, and give further insight into the function this protein plays in the virus replication cycle.

METHODS

Cells, viruses and antibodies. The monkey kidney epithelial cell line MA104 was grown in Eagle's minimal essential medium (MEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, and was used for all experiments carried out in this work. The rhesus rotavirus strain RRV (P5B,G3) and the human rotavirus strain Wa (P1A,G1) were obtained from Dr. H. B. Greenberg, Stanford University, Stanford, CA; the bovine rotavirus strain RF (P6,G6) was kindly provided by Dr. J. Cohen, CNRS-INRA, Gif-sur-Yvette, France; and the lapine strain Alabama (P[14],G3) was obtained from Dr. M. Conner, Baylor College of Medicine Houston, TX. All rotavirus strains were propagated in MA104 cells as described previously (Pando *et al.*, 2002). Monoclonal antibodies (mAbs) to VP2 (mAb 3A8), VP6 (mAb 255/60), NSP4 (mAb B4) and VP7 (mAb 60) were kindly provided by Dr. H. B. Greenberg. Rabbit polyclonal sera to NSP2 and NSP5 have been described previously (González *et al.*, 2000). Polyclonal antibodies to purified RRV TLPs were produced in rabbits as described previously (López *et al.*, 2005). Antibodies to vimentin were raised in rabbits by immunization with human recombinant vimentin produced in bacteria, expressed from a plasmid kindly provided by Dr. J. F. Hess, University of California, Davis, CA. Polyclonal antibodies to a fragment of RRV VP4 (aa 474–776) synthesized in, and purified from, bacteria as described previously (Zarate *et al.*, 2003), were produced in rabbits. Alexa-488- and -568-conjugated secondary antibodies were purchased from Molecular Probes (Eugene). Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit polyclonal antibody was from Perkin Elmer Life Sciences and horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse IgG was from Zymed.

Sequence and lipofection of small interfering RNAs (siRNAs). For this work two NSP5 siRNAs corresponding to nt 95–115 (siRNA^{NSP5-1}) and 244–264 (siRNA^{NSP5-2}) of rotavirus RRV gene 11 (Mohan & Atreya, 2001) were purchased from Dharmacon Research. siRNA^{NSP5-1} had the sequence 5'-UCUUAUUGGUAGGAGUGAACCTT-3' (sense), 5'-GUUCACUCCUACCAAUAGATT-3' (antisense), while siRNA^{NSP5-2} had the sequence 5'-GACAAAUGCAGACGUGGCTT-3' (sense), 5'-GCCAGCGUCGCAUUUGU-CTT-3' (antisense). Both NSP5 siRNAs silenced the expression of gene 11 with similar efficiency. As a negative control a previously reported lamin siRNA was used (Dector *et al.*, 2002; Elbashir *et al.*, 2001). Confluent monolayers of MA104 cells in 48- or 96-well plates were lipofected with 100 or 50 µl, respectively, of a mixture containing 40 µg lipofectamine (Invitrogen) ml⁻¹ and 600 pmol siRNAs ml⁻¹ in MEM without serum. The transfection mixture was added to cells previously washed with MEM and incubated for 8 h at 37°C. After this time the transfection mixture was removed, the cells were washed with MEM and kept in this medium without serum or antibiotics for 36 h at 37°C, before being infected at an m.o.i. of 3.

Infection of cells and titration of viral progeny. Cell monolayers in 96-well plates were infected with an m.o.i. of 3 as described

previously (Pando *et al.*, 2002), and then incubated for 14–16 h at 37 °C. At this time the cells were lysed by two freeze–thaw cycles, and the lysates were treated with 10 µg trypsin ml⁻¹ for 30 min at 37 °C. The infectious titre of the viral preparations was obtained by an immunoperoxidase focus assay (Pando *et al.*, 2002).

Immunoblots. Cells were transfected with siRNAs and infected with individual rotavirus strains RRV, Wa, RF or Alabama as described above. At 12 h post-infection (p.i.) the cells were lysed with Laemmli sample buffer, the proteins separated by 14% SDS-PAGE and transferred to Immobilon-NC (Millipore). The transferred proteins were incubated with a mixture of rabbit polyclonal antibodies to purified rotavirus RRV, NSP5 and vimentin, and the bound antibodies were developed by incubation with a peroxidase-labelled anti-rabbit antibody (Perkin-Elmer Life Sciences) and the Western Lightning system (Perkin-Elmer).

Radiolabelling of proteins and RNA. For protein labelling, cells grown in 48-well plates were transfected with siRNAs and infected with rotavirus RRV as described above. At the indicated times, the medium was replaced by MEM without methionine, supplemented with 50 µCi (1.85 MBq) Easy Tag Express ³⁵S-labelling mix (Dupont NEN) ml⁻¹ and incubated for 30 min; after this period the cells were washed and lysed with Laemmli sample buffer. The relative concentration of protein in each sample was adjusted by eye inspection of Coomassie blue-stained gels, and the same amount of protein in each sample was resolved by 11% SDS-PAGE. For RNA labelling, cells grown in 12-well plates were transfected with siRNAs and infected with rotavirus RRV as described above. After the virus adsorption period, actinomycin (5 µg ml⁻¹; Sigma) was added to the cells; 1 h later 50 µCi [³²P]orthophosphate (Dupont NEN) ml⁻¹ was added in phosphate-free MEM containing actinomycin, and the cells were further incubated for 10 h at 37 °C. At this time total RNA was extracted from the cells with Trizol (Invitrogen). ssRNA and dsRNA were resolved in denaturing 7 M urea polyacrylamide gels as described previously (Silvestri *et al.*, 2004). Radiolabelled RNAs were detected with a Molecular Dynamics PhosphorImager.

Analysis of genomic dsRNA. Genomic dsRNA was isolated from viral lysates and analysed by PAGE and silver staining as described previously (Herring *et al.*, 1982).

Immunofluorescence. MA104 cells were grown on coverslips and infected as described above. The cells were fixed 8 h p.i. with 2% paraformaldehyde and permeabilized with 0.5% Triton X-100 in 1% BSA, as described previously (Dector *et al.*, 2002). The cells were then incubated with either rabbit polyclonal sera to NSP2, NSP5 or VP4, or with mAbs 3A8, 255/60, 60 or B4, followed by staining with goat anti-mouse IgG coupled to Alexa-568 or goat anti-rabbit IgG coupled to Alexa-488 (Molecular Probes). The slides were analysed with a Bio-Rad MRC-600 confocal microscope and CoMOS MPL-1000 software.

Real-time RT-PCR. The level of gene 10 RNA (+), which includes both gene 10 mRNA and the positive-strand RNA present in gene 10 dsRNA, was quantified by real-time RT-PCR. Briefly, MA104 cells grown in 12-well plates were transfected with siRNAs and infected with rotavirus RRV as described above. At the indicated times the cells were lysed with Trizol and total RNA was purified according to manufacturer's instructions. cDNA was synthesized from 0.1 to 1 ng of total RNA using primer 5'-TCCTGGAA-TGGCGTATTTTC-3', which corresponds to nt 122–141 of RRV gene 10. The DNA was then amplified in the presence of a SybrGreen PCR master mix (Applied Biosystems) by addition of reverse primer 5'-GAGCAATCTTCATGGTTGGAA-3' (nt 173–193 of RRV gene 10), using an ABI Prism 7000 detection system (Applied Biosystems). The results were normalized to the levels of GAPDH mRNA detected in each RNA sample (Winer *et al.*, 1999).

RESULTS

Silencing the expression of rotavirus gene 11 reduces viral progeny and viral protein synthesis

To study the relevance of gene 11 products in the context of a viral infection, two siRNAs (siRNA^{NSP5-1} and siRNA^{NSP5-2}) corresponding to the sequence of rotavirus RRV gene 11 (Mohan & Atreya, 2001) were synthesized and transfected into MA104 cells. The cell monolayers were infected 36 h post-transfection with rotavirus strain RRV at an m.o.i. of 3, and 14–16 h later the titre of viral progeny produced was determined by a focus-forming assay. The two siRNAs tested interfered with the replication of RRV with similar efficiency; the infectious viral progeny produced in cells transfected with either siRNA was reduced by 70–80% as compared with the yield of RRV obtained from cells transfected with an irrelevant, control siRNA (Table 1). To confirm that the synthesis of NSP5 was being specifically blocked by the siRNAs, cells transfected with siRNA^{NSP5-1} were infected with rotavirus RRV, and 12 h p.i. the viral proteins were analysed by immunoblotting, using a mixture of rabbit polyclonal sera to NSP5, to purified RRV TLPs, and to vimentin as an internal loading control (Fig. 1a). As expected, the amount of NSP5 was drastically reduced, however, a reduction in the level of the structural viral proteins VP4, VP6 and VP7 was also observed, while the level of vimentin was not altered. The general reduction in the synthesis of both structural and non-structural viral proteins was confirmed by SDS-PAGE analysis of viral proteins metabolically labelled with an ³⁵S-labelling mix, produced in an infection made in the presence or absence of the siRNA to NSP5 (Fig. 1b).

It has been reported that siRNAs can activate the interferon system, causing a non-specific inhibition of cell protein

Table 1. Effect of silencing gene 11 on rotavirus progeny yield (%)

The titre of viral progeny was determined by an immunoperoxidase focus assay. Results are expressed as the percentage of virus yield obtained in cells transfected with the NSP5 siRNAs with respect to a control siRNA. ND, Not done.

siRNA	Rotavirus strain			
	RRV	RF	Wa	Alabama
Control*	100	100	100	100
NSP5-1	28 ± 4.5	32 ± 6.3	92 ± 6.5	ND
NSP5-2	20 ± 6.4	ND	ND	50 ± 7.8

*The viral progeny titre in siRNA control-transfected cells was 2 × 10⁶ focus-forming units ml⁻¹ for RRV, 1 × 10⁵ for Wa, 5 × 10⁶ for RF and 6 × 10⁵ for Alabama. The arithmetic mean and standard deviation of four independent experiments performed in duplicate are shown.

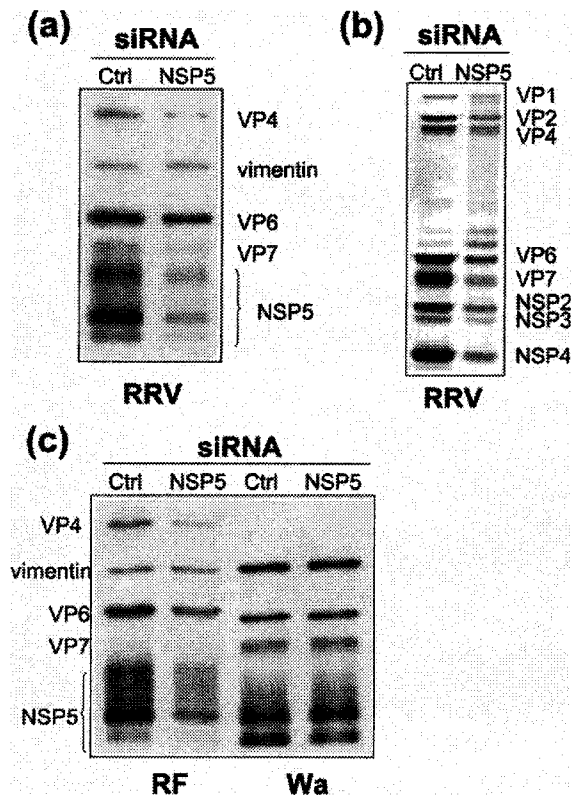


Fig. 1. Silencing rotavirus gene 11 causes a general reduction of viral protein synthesis. (a) Immunoblot analysis of rotavirus RRV structural proteins synthesized in cells transfected with the indicated siRNA. Vimentin was used as an internal loading control. The transferred proteins were incubated with a mixture of polyclonal antibodies to purified rotavirus RRV, NSP5 and vimentin, and the bound antibodies were developed by incubation with a peroxidase-labelled anti-rabbit immunoglobulin antibody. (b) MA104 cells were transfected with the indicated siRNA and infected with rotavirus RRV as described in Methods. At 11.5 h p.i. cells were pulse-labelled for 30 min with an ^{35}S -labelling mix, and then lysed in Laemmli sample buffer. The labelled proteins were resolved by SDS-PAGE and detected by autoradiography. (c) Immunoblot analysis of rotavirus strains RF and Wa carried out as described in (a). In all cases the amount of loaded protein was previously adjusted by eye inspection of Coomassie blue-stained gels; the amount of vimentin was used as an internal control to verify that the loaded protein was comparable in each case. The siRNAs used in these assays were siRNA^{NSP5-1} (NSP5) or an irrelevant siRNA (Ctrl).

synthesis (Kim *et al.*, 2004; Persengiev *et al.*, 2004; Sledz *et al.*, 2003). To evaluate if the general inhibition of the synthesis of viral protein induced by siRNA^{NSP5-1} was specific, we analysed the effect of this siRNA on the production of viral progeny and viral protein synthesis of the human rotavirus strain Wa and the bovine rotavirus strain RF. The sequence

of siRNA^{NSP5-1} corresponding to RRV gene 11 is identical in rotavirus RF, but differs in rotavirus Wa gene 11 by 2 nt (at positions 14 and 15 of the sense sequence). If the siRNA is inducing a non-specific effect, the production of the viral progeny of all three viruses should be affected. As shown in Table 1, siRNA^{NSP5-1} did not affect the production of rotavirus Wa progeny, but had a strong effect in the case of RF, similar to that observed for RRV. Also, immunoblot analysis of the viral proteins synthesized in the presence of siRNA^{NSP5-1} showed that this siRNA, but not a control siRNA, reduced the accumulation of NSP5 and other viral proteins in cells infected with rotavirus RF, but not in cells infected with rotavirus strain Wa (Fig. 1c). These results indicate that the reduction in viral progeny and viral protein expression is a consequence of the specific inhibition of the expression of gene 11 induced by siRNA^{NSP5-1}.

Interference of rotavirus gene 11 expression reduces the general synthesis of viral mRNAs and genomic dsRNA

To analyse the effect of silencing the expression of gene 11 on the synthesis of viral messenger and genomic RNA, siRNA^{NSP5-1}-transfected cells were infected with RRV, the cells were labelled with [^{32}P]orthophosphate for 10 h, starting 2 h p.i., followed by the extraction of total RNA from the cell lysates and analysis by PAGE, using the conditions described by Silvestri *et al.* (2004) that allow the detection of viral mRNAs and most segments of dsRNA (Fig. 2a). A reduction in the accumulation of all viral transcripts and dsRNA was observed in the presence of siRNA^{NSP5-1} as compared with cells transfected with an irrelevant siRNA. The amount of viral dsRNA synthesized was also analysed by PAGE and silver staining of unlabelled dsRNA extracted at 12 h p.i. Similar to what was observed for ^{32}P -labelled RNA, the amount of dsRNA was also found to be diminished in cells transfected with siRNA^{NSP5-1}, as compared with cells transfected with a control siRNA or with an siRNA to RRV VP4 (Dector *et al.*, 2002) (Fig. 2b).

Interfering with the expression of NSP5 in a rotavirus strain lacking a complete ORF for NSP6

Gene 11 of some rotavirus strains does not contain the complete NSP6 ORF present in most strains, which potentially encodes a protein of 92 aa. In some cases, e.g. rotavirus strain OSU, the NSP6 ORF encodes a 51 aa protein, while in others, like rotavirus strains Alabama or Mc323, there is no initiator AUG at the beginning of the potential second ORF, but it is not known whether a shorter NSP6, starting from a downstream AUG could be synthesized (Fig. 3b). To test if NSP6 contributes to the phenotype observed when gene 11 is silenced, we characterized the yield of viral progeny and viral protein synthesis in cells infected with the lapine rotavirus strain Alabama in the presence of an NSP5 siRNA. Rotavirus strain Alabama was chosen, since rotavirus OSU has already been tested (Campagna *et al.*, 2003), and rotavirus strain Mc323 was not available. Since

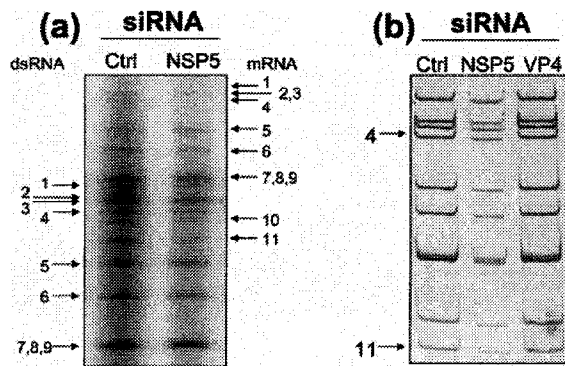


Fig. 2. Silencing rotavirus gene 11 decreases the synthesis of viral RNA. (a) Total RNA was purified from RRV-infected cells metabolically labelled with [32 P]orthophosphate that had been previously transfected with either a siRNA control (Ctrl) or siRNA^{NSP5-1} (NSP5). The viral mRNAs and dsRNA genes were separated by PAGE under conditions as described in Methods and detected by a PhosphorImager. The genomic dsRNA segments (indicated at left) and the viral mRNAs (indicated at right) were identified by running 32 P-labelled viral dsRNA as a marker (not shown). (b) Total dsRNA was purified from cell lysates of RRV-infected cells that had been previously transfected with either a siRNA control (Ctrl), siRNA^{NSP5-1} (NSP5) or a siRNA to rotavirus RRV VP4 gene (VP4). The extracted dsRNA segments were separated by PAGE and detected by silver staining. The position of the genes 4 and 11 encoding VP4 and NSP5, respectively, is indicated. The same volume fraction from the total volume collected for each sample was loaded in the gel.

siRNA^{NSP5-1} has two mismatches with the target sequence of Alabama gene 11, we used siRNA^{NSP5-2}, whose target sequence is identical in rotaviruses RRV and Alabama. The interference of gene 11 expression in Alabama reduced the production of viral progeny (Table 1) and the synthesis of viral protein (Fig. 3a), although the inhibition of viral progeny was somewhat lower (50%) as compared with that achieved with RRV (80%).

Intracellular distribution of several viral proteins is altered in gene 11-silenced cells

The level of reduction achieved in the titre of RRV viral progeny and viral protein synthesis in cells transfected with siRNA^{NSP5-1} is consistent with the efficiency of transfection achieved with this siRNA, of about 70% (data not shown and Dector *et al.*, 2002). These results suggest that the viral proteins and infectious virus produced in the cells successfully transfected with siRNA^{NSP5-1} is none or very low. Thus, to determine the effect of silencing rotavirus gene 11 on the synthesis of NSP5 and other viral proteins at the individual cell level, siRNA^{NSP5-1}-transfected cells were infected with RRV at an m.o.i. of 3, and examined by immunofluorescence with mono-specific sera to different proteins. NSP5 was still detectable and localized to

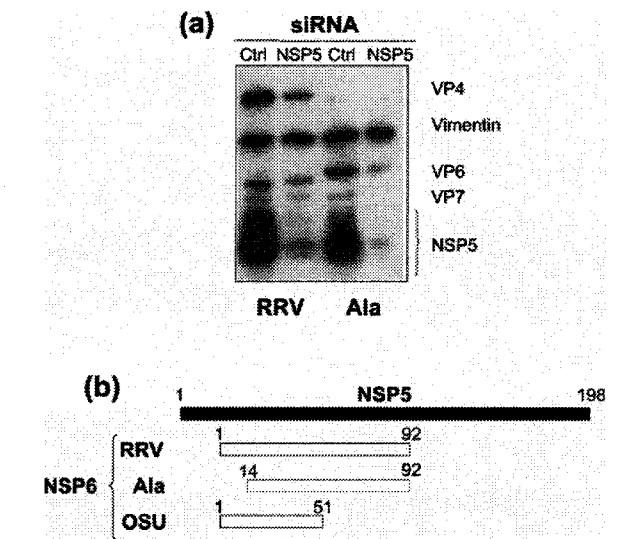


Fig. 3. Silencing the NSP5 gene of rotavirus Alabama reduces the general synthesis of viral proteins. (a) Immunoblot analysis of rotavirus structural proteins (strains RRV and Alabama -Ala- as indicated) synthesized in cells transfected with either siRNA^{NSP5-2} (NSP5) or an irrelevant siRNA (Ctrl), as indicated. Vimentin was used as an internal loading control. The transferred proteins were incubated with a mixture of polyclonal antibodies to purified rotavirus RRV, NSP5 and vimentin, and the bound antibodies were developed by incubation with a peroxidase-labelled anti-rabbit immunoglobulin antibody. (b) Schematic representation of RRV NSP5 and the NSP6 protein from rotavirus strains RRV, Alabama and OSU. NSP6 and NSP5 are placed according to their relative positions in gene 11 of the ORFs that encode them. Alabama NSP6 is depicted with a dotted line, since it is not known if this protein is synthesized in infected cells.

viroplasm in most cells, although the number and size of viroplasms was reduced as compared with cells transfected with an siRNA control (Fig. 4, panel NSP5). These results confirm the reduction of the synthesis of NSP5 observed by immunoblot and indicate that silencing of gene 11 expression by siRNA^{NSP5-1}, although efficient, does not completely prevent the synthesis of NSP5.

The immunofluorescence analysis of viral proteins other than NSP5 in cells infected in the presence of siRNA^{NSP5-1} showed, as expected, a reduced signal, but also an altered intracellular distribution (Fig. 4). Most of NSP2 and VP2 were found to co-localize with NSP5 in viroplasms, as in control cells, but a fraction of these proteins was also found dispersed in the cytoplasm. In the case of VP4, the ring-like or semicircular structures observed in control cells, which have been reported to be closely associated to viroplasms (González *et al.*, 2000), disappeared leaving a finely punctated pattern. The filamentous distribution of VP4, which has been suggested to result from the association

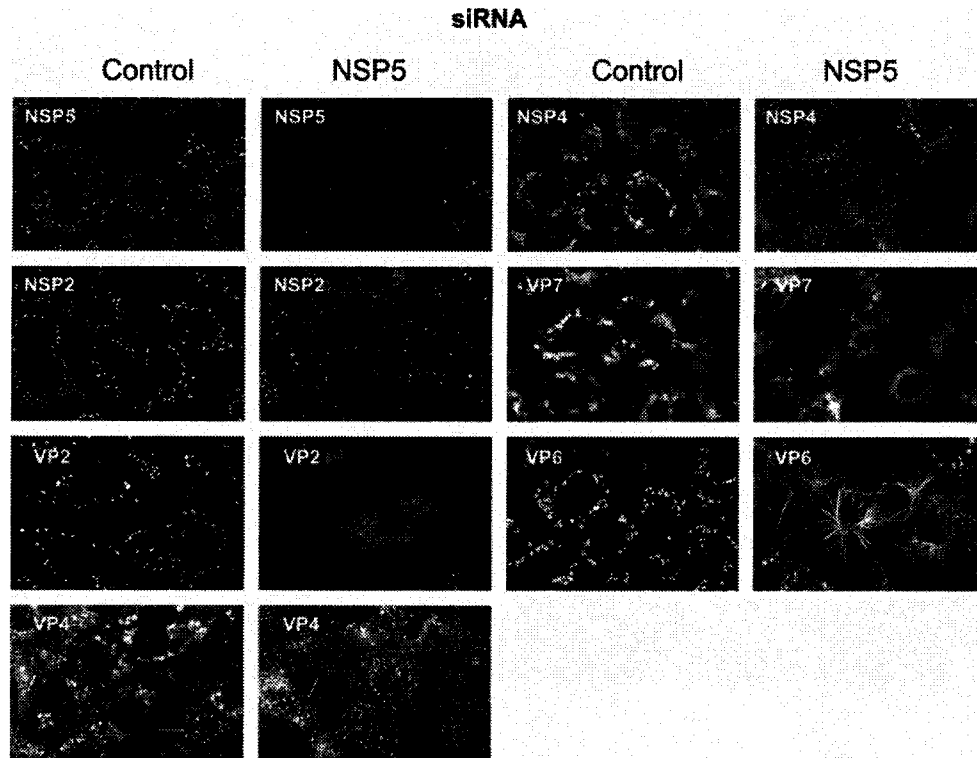


Fig. 4. The distribution of viral proteins is altered in cells transfected with the NSP5 siRNA. The synthesis and intracellular distribution of NSP5 and other viral proteins in rotavirus RRV-infected cells in the presence of siRNA^{NSP5-1} (NSP5) or an unrelated siRNA (Control), as indicated, was determined. The cells were fixed at 8 h p.i. and stained with either mAbs to VP2 (3A8), NSP4 (B4), VP7 (60) or VP6 (255/60), or with polyclonal antibodies to NSP2, NSP5 or VP4 as primary antibodies, as indicated inside each image, followed by incubation with goat anti-mouse IgG coupled to Alexa-568 or goat anti-rabbit IgG coupled to Alexa-488, as secondary antibodies.

of this protein with microtubules (González *et al.*, 2000; Nejmeddine *et al.*, 2000) was maintained and detected in both control and NSP5-silenced cells (see arrows in Fig. 4, panel VP4). Similar to VP4, the distribution of NSP4 also changed from a viroplasm-associated ring-like appearance (González *et al.*, 2000) to a more dispersed finely punctated pattern. VP7 also changed its distribution from a predominant ring-like pattern associated with viroplasm (González *et al.*, 2000) in control cells, to a more diffuse perinuclear signal. The more drastic change observed, however, was the distribution of VP6, where most of the protein shifted from a viroplasm location to a fibrous array in the cytoplasm. The fibres of VP6 did not co-localize with tubulin, actin or vimentin (data not shown).

Silencing the expression of gene 11 blocks late viral transcription and protein synthesis

The reduced synthesis of viral protein, mRNA, dsRNA and progeny particles described above, suggests that the inhibition of gene 11 expression blocks the replication

of the viral genome and the putative second round of transcription. If this is correct, one would expect that the primary synthesis of viral mRNA and protein that takes place early after infection would not be affected (except for NSP5), but the inhibition would be evident rather late in the replication cycle, when the secondary round of transcription and translation occurs. To test this hypothesis, MA104 cells were infected with rotavirus RRV at an m.o.i. of 3, and the infected cells were pulse-labelled every hour for 30 min with an ³⁵S-labelling mix, starting 1 h after infection (Fig. 5a). The level of NSP5 was detected by immunoblot using the same samples shown in Fig. 5(a) (Fig. 5b). The inhibition of the synthesis of NSP5 was already evident at 2 h p.i., a time point at which this protein was first detected in control cells. In contrast, the synthesis of the rest of the viral proteins was similar in the NSP5 siRNA- and control siRNA-transfected cells until 3 h p.i., while the inhibition of their synthesis started to be noticed at 4 h p.i. and was maximal at 6–8 h p.i.

We also determined the accumulation of gene 10 RNA(+)

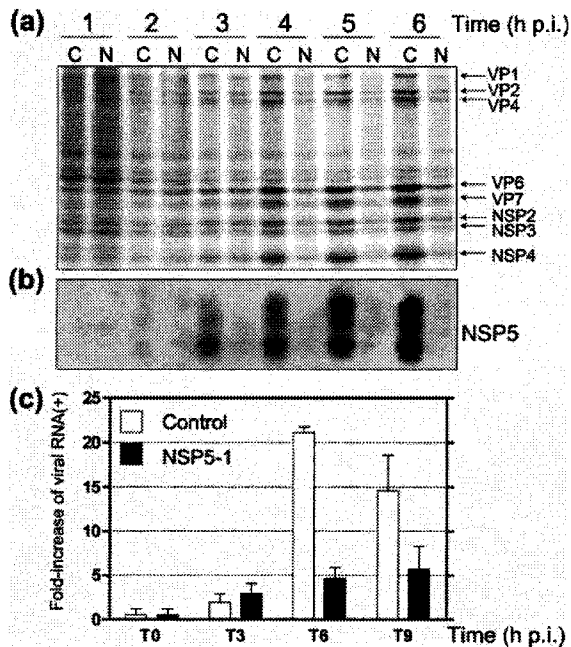


Fig. 5. Reduction in NSP5 expression causes a time-dependent decrease of viral RNA and protein synthesis. (a) MA104 cells lipofected with either an irrelevant siRNA (C) or siRNA^{NSP5-1} (N) were infected with rotavirus RRV, and at indicated times p.i. the cells were pulsed-labelled for 30 min with an ³⁵S-labelling mix. The cells were then lysed in Laemmli sample buffer and the proteins separated by SDS-PAGE and detected by autoradiography. (b) The same samples described in (a) were transferred onto a nitrocellulose membrane and the accumulated NSP5 was analysed by immunoblot using an antibody to NSP5. The amount of protein loaded in each lane was previously adjusted by eye inspection of Coomassie blue-stained gels. (c) Cells lipofected with either control (open bars) or NSP5-1 (closed bars) siRNAs, as indicated, were infected with rotavirus RRV, and at the indicated times (T0, T3, T6, and T9 at 0, 3, 6 and 9 h p.i., respectively) total RNA was extracted with Trizol, and the levels of gene 10 RNA(+) were determined by real-time RT-PCR. The results are expressed as fold-increase over the levels detected at time zero of infection (immediately after the end of the virus adsorption period). The arithmetic mean, with one standard deviation, of two independent experiments is shown.

at different times p.i. by semi-quantitative RT-PCR (Fig. 5c). Gene 10 was selected as marker of the general synthesis of viral RNA, since the RT-PCR conditions for its measurement were already set up in the laboratory (C. Ayala-Breton and others, unpublished data). Similar to what was observed for protein synthesis, at 3 h p.i. the gene 10 RNA(+) levels were similar in cells infected in the presence of the siRNA^{NSP5-1}, as compared to control cells, while a clear difference between these two conditions was found at 6 h p.i.

DISCUSSION

It has been suggested that rotavirus non-structural protein NSP5 is involved at several stages during the replication of the viral genome, including the formation of viroplasm, the transport of viral RNAs (+) to these inclusions, and the preparation of these RNAs for packaging and replication (Patton *et al.*, 2003). NSP5 has also been implicated in the regulation of the translation of viral mRNAs (Chnaiderman *et al.*, 2002) and, given its capacity for binding dsRNA, in blocking the interferon-induced RNA-dependent activation of protein kinase PKR (Vende *et al.*, 2002). However, with exception of its ability to form viroplasm-like structures when transiently expressed in uninfected cells (Fabbretti *et al.*, 1999; Mohan *et al.*, 2003), there is no direct evidence either *in vivo* or *in vitro* for its suggested functions. In this work, we studied the role of NSP5 in the context of a viral infection, using RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells.

Although the RNAi response induced by siRNA^{NSP5-1} most probably inhibits the synthesis of both NSP5 and NSP6, the block in virus replication, as well as the reduced synthesis of viral components observed in this work is most likely the result of the impaired levels of synthesis of NSP5. This conclusion is supported by the following observations: (i) an ORF encoding a full-length NSP6 is not present in gene 11 of some group A rotaviruses (strains Mc323, Alabama, 512-C and OSU – GenBank accession numbers U54772, J04361, AB008662 and X15519, respectively) and is missing in all group C rotavirus strains (Torres-Vega *et al.*, 2000), suggesting that NSP6 is not essential for the replication of the virus; (ii) the expression of intracellular antibodies to NSP5 caused a phenotype similar to that described in this work (Vascotto *et al.*, 2004); (iii) silencing the expression of gene 11 of porcine rotavirus strain OSU, which encodes a truncated NSP6 ORF, resulted in the general reduction of viral protein synthesis and inhibition of rotavirus replication (Campagna *et al.*, 2003.); and (iv) the inhibition effect of siRNA^{NSP5-2} on the replication and protein synthesis of rotavirus Alabama described in this work was similar to that observed for rotavirus RRV. The gene 11 of Alabama strain does not have an AUG codon at the beginning of the ORF that would code for a 92 aa NSP6 protein, like most other rotavirus strains. It rather has an in-phase downstream AUG that could potentially code for a protein of 79 aa. If this protein is indeed synthesized and if it is functional, it would imply that the 79 carboxy-terminal amino acids of NSP6 are enough to sustain its function. Furthermore, as mentioned above, rotavirus OSU gene 11 produces a 51 aa truncated version of NSP6, and its silencing also causes a reduction of viral protein and genomic dsRNA synthesis (Campagna *et al.*, 2003). Although it is not possible to discard a central role of NSP6 in rotavirus replication, these observations suggest that most probably NSP6 plays a regulatory role of the NSP5 activity, as previously suggested (Torres-Vega *et al.*, 2000), a role that might have been substituted somehow in the strains that lack the full-length NSP6.

Gene 11-silenced cells showed fewer and smaller viroplasm than cells transfected with the control siRNA, as well as a partial delocalization of viroplasmic proteins VP2, NSP2 and VP6 (Fig. 4), strongly suggesting that NSP5 is essential to nucleate the formation of these cytoplasmic inclusions (Fabbretti *et al.*, 1999). It would appear that in the absence of a regular amount of NSP5 the number and size of viroplasm decreases, causing that only a fraction of viroplasmic proteins anchors to these structures, while the 'excess' of these proteins redistributes in the cytoplasm. In contrast to NSP2 and VP2, whose 'excess' became homogeneously distributed in the cytoplasm, VP6 showed a dramatic redistribution into fibrous structures that appear to extend to the periphery of the cell. The reason for this fibrous pattern of VP6 is not clear, since the VP6 fibres did not co-localize with vimentin, actin or tubulin, and had variable thickness (data not shown). The distribution of VP6 into fibres was also observed when the expression of NSP4 was silenced (López *et al.*, 2005); in that case, the amounts of NSP2 and NSP5 were also reduced, and the mean size of the viroplasm was also smaller, suggesting that the distribution of VP6 is sensitive to the concentration of proteins that accumulate in viroplasm and that treatments that alter this concentration cause VP6 to redistribute as fibres. The reason for this delocalization is not clear, but NSP5 might have an unrecognized role in the recruitment of viral proteins to viroplasm. Direct interaction with NSP5 has been demonstrated for NSP6, NSP2, VP1 and VP2, and changes in the distribution of VP2 were observed when NSP5 was co-expressed in insect cells (Berois *et al.*, 2003). In the case of VP6, there are no reports describing a direct interaction with NSP5 and, in fact, NSP5 has been reported to dislodge VP6 from virus-like particles formed by VP2 and VP6 (Berois *et al.*, 2003). Recently, it was shown that the inhibition of NSP2 expression also inhibits viroplasm formation, genome replication, virus assembly, and the synthesis of the viral proteins (Silvestri *et al.*, 2004); however, the intracellular distribution of the viral proteins in NSP2-deficient cells was not characterized. VP4, VP7 and NSP4, which are not integral viroplasmic proteins but are closely associated to these structures (González *et al.*, 2000), were also delocalized in gene 11-silenced cells, probably as an indirect effect of the reduced size and number of viroplasm.

The data presented in this work support the existence of a second round of transcription driven by *de novo* synthesized DLPs (Fig. 5). The impaired number and size of viroplasm produced in gene 11-silenced cells probably causes a decreased production of DLPs that results in a deficient secondary synthesis of viral mRNA, with the consequent reduction of: (i) the synthesis of viral proteins and genomic dsRNA; (ii) the formation of 'healthy' viroplasm; and (iii) the assembly of DLPs, and eventually infectious TLPs. As predicted by this model, early after virus infection (3 h or earlier) of siRNA^{NSP5}-transfected cells only the accumulation of NSP5 (the siRNA target) is clearly affected (Fig. 5a), while the synthesis of other viral proteins and of RNA(+), as judged from the levels of gene 10 RNA, are not

affected, indicating that at the beginning of infection the RNA(+) is mostly produced by the parental infecting DLP. At later times (4 h p.i. and later) all viral proteins and viral RNA(+) start to be inefficiently produced because, in the absence of NSP5, viroplasm are scarce, and a limited amount of progeny DLPs are assembled, with the consequent reduction in viral protein and RNA(+), and an inhibition of the production of progeny infectious virus. Experiments are currently being carried out in our laboratory to characterize in detail the timing of transcription and replication of the virus genome during the rotavirus infection cycle, and the effect on this timing of silencing the expression of various structural and non-structural viral proteins.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Andrés Saralegui for his excellent technical assistance with the confocal microscope and to Pedro Romero for preparing and purifying the viruses. This work was partially supported by grants 55003662 and 55000613 from the Howard Hughes Medical Institute, and G37621N from the National Council for Science and Technology-Mexico.

REFERENCES

- Afrikanova, I., Miozzo, M. C., Giambiagi, S. & Burrone, O. R. (1996). Phosphorylation generates different forms of rotavirus NSP5. *J Gen Virol* 77, 2059–2065.
- Arias, C. F., Dector, M. A., Segovia, L., Lopez, T., Camacho, M., Isa, P., Espinosa, R. & Lopez, S. (2004). RNA silencing of rotavirus gene expression. *Virus Res* 102, 43–51.
- Berois, M., Sapin, C., Erk, I., Poncet, D. & Cohen, J. (2003). Rotavirus nonstructural protein NSP5 interacts with major core protein VP2. *J Virol* 77, 1757–1763.
- Blackhall, J., Muñoz, M., Fuentes, A. & Magnusson, G. (1998). Analysis of rotavirus nonstructural protein NSP5 phosphorylation. *J Virol* 72, 6398–6405.
- Campagna, M., Vascotto, F., Eichwald, C. & Burrone, O. R. (2003). Interfering with rotavirus NSP5. In *Eighth International Symposium on Double Stranded RNA Viruses*. Italy: Castelvecchio Pascoli (Lucca).
- Chnaiderman Xiao, J., Barro, M. & Spencer, E. (2002). NSP5 phosphorylation regulates the fate of viral mRNA in rotavirus infected cells. *Arch Virol* 147, 1899–1911.
- Dector, M. A., Romero, P., López, S. & Arias, C. F. (2002). Rotavirus gene silencing by small interfering RNAs. *EMBO Rep* 3, 1175–1180.
- Eichwald, C., Vascotto, F., Fabbretti, E. & Burrone, O. R. (2002). Rotavirus NSP5: mapping phosphorylation sites and kinase activation and viroplasm localization domains. *J Virol* 76, 3461–3470.
- Eichwald, C., Jacob, G., Muszynski, B., Allende, J. E. & Burrone, O. R. (2004). Uncoupling substrate and activation functions of rotavirus NSP5: phosphorylation of Ser-67 by casein kinase 1 is essential for hyperphosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 16304–16309.
- 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.

- Estes, M. K. (2001).** Rotaviruses and their replication. In *Fields Virology*, 4th edn, pp. 1747–1785. Edited by D. N. Knipe & P. M. Howley. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Fabbretti, E., Afrikanova, I., Vascotto, F. & Burrone, O. R. (1999).** Two non-structural rotaviral proteins, NSP2 and NSP5, form viroplasm-like structures *in vitro*. *J Gen Virol* **80**, 333–339.
- González, S. A. & Burrone, O. R. (1991).** Rotavirus NS26 is modified by addition of single O-linked residues of N-acetylglucosamine. *Virology* **182**, 8–16.
- González, R. A., Espinosa, R., Romero, P., López, S. & Arias, C. F. (2000).** Relative localization of viroplasmic and endoplasmic reticulum-resident rotavirus proteins in infected cells. *Arch Virol* **145**, 1963–1973.
- Herring, A. J., Inglis, N. F., Ojeh, C. K., Snodgrass, D. R. & Menzies, J. D. (1982).** Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *J Clin Microbiol* **16**, 473–477.
- Kim, D. H., Longo, M., Han, Y., Lundberg, P., Cantin, E. & Rossi, J. J. (2004).** Interferon induction by siRNAs and ssRNAs synthesized by phage polymerase. *Nat Biotechnol* **22**, 321–325.
- López, T., Camacho, M., Zayas, M., Nájera, R., Sánchez, R., Arias, C. F. & López, S. (2005).** Silencing the morphogenesis of rotavirus. *J Virol* **79**, 184–192.
- 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.
- Mohan, K. V. K. & Atreya, C. D. (2001).** Nucleotide sequence analysis of rotavirus gene 11 from two tissue culture-adapted ATCC strains, RRV and Wa. *Virus Genes* **23**, 321–329.
- Mohan, K. V. K., Muller, J., Som, I. & Atreya, C. D. (2003).** The N- and C-terminal regions of rotavirus NSP5 are critical determinants for the formation of viroplasm-like structures independent of NSP2. *J Virol* **77**, 12184–12192.
- Nejmeddine, M., Trugnan, G., Sapin, C., Kohli, E., Svensson, L., López, S. & Cohen, J. (2000).** Rotavirus spike protein VP4 is present at the plasma membrane and is associated with microtubules in infected cells. *J Virol* **74**, 3313–3320.
- Nibert, M. L. & Schiff, L. A. (2001).** Reovirus and their replication. In *Fields Virology*, 4th edn, pp. 1679–1728. Edited by D. M. Knipe & P. M. Howley. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Pando, V., Isa, P., Arias, C. F. & Lopez, S. (2002).** Influence of calcium on the early steps of rotavirus infection. *Virology* **295**, 190–200.
- Patton, J. T. (1995).** Structure and function of the rotavirus RNA-binding proteins. *J Gen Virol* **76**, 2633–2644.
- Patton, J. T., Kearny, K. & Taraporewala, Z. F. (2003).** Rotavirus genome replication: role of the RNA-binding proteins. In *Viral Gastroenteritis*, pp. 165–184. Edited by U. Desselberger & J. Gray. Amsterdam: Elsevier.
- Persengiev, S. P., Zhu, X. & Green, M. R. (2004).** Nonspecific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs). *RNA* **10**, 12–18.
- Petrie, B. L., Greenberg, H. B., Graham, D. Y. & Estes, M. K. (1984).** Ultrastructural localization of rotavirus antigens using colloidal gold. *Virus Res* **1**, 133–152.
- Silvestri, L. S., Taraporewala, Z. F. & Patton, J. T. (2004).** Rotavirus replication plus-sense templates for double-stranded RNA synthesis are made in viroplasms. *J Virol* **78**, 7763–7774.
- Sledz, C. A., Holko, M., de Veer, M. J., Silverman, R. H. & Williams, B. R. (2003).** Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol* **5**, 834–839.
- Taraporewala, Z. F. & Patton, J. T. (2004).** Nonstructural proteins involved in genome packaging and replication of rotaviruses and others members of the Reoviridae. *Virus Res* **101**, 57–66.
- Torres-Vega, M. A., González, R. A., Duarte, M., Poncet, D., López, S. & Arias, C. F. (2000).** The C-terminal domain of rotavirus NSP5 is essential for its multimerization, hyperphosphorylation and interaction with NSP6. *J Gen Virol* **81**, 821–830.
- Vascotto, F., Campagna, M., Visintin, M., Cattaneo, A. & Burrone, O. R. (2004).** Effects of intrabodies specific for rotavirus NSP5 during the virus replicative cycle. *J Gen Virol* **85**, 3285–3290.
- Vende, P., Taraporewala, Z. F. & Patton, J. T. (2002).** RNA-binding activity of the rotavirus phosphoprotein NSP5 includes affinity for double-stranded RNA. *J Virol* **76**, 5291–5299.
- Winer, J., Jung, C. K. S., Shackel, I. & Williams, M. (1999).** Development and validation of a real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes *in vitro*. *Anal Biochem* **270**, 41–49.
- Zarate, S., Cuadras, M. A., Espinosa, R., Romero, P., Juarez, K. O., Camacho-Nuez, M., Arias, C. F. & Lopez, S. (2003).** Interaction of rotaviruses with Hsc70 during cell entry is mediated by VP5. *J Virol* **77**, 7254–7260.

DISCUSIÓN

Actualmente no existe un sistema de genética reversa que permita estudiar la función de las proteínas de rotavirus, por lo cual la función de NSP5 y otras proteínas de rotavirus se ha estudiado por métodos indirectos. Como alternativa, en este trabajo se utilizó el sistema de RNAi para inhibir la síntesis de NSP5.

El efecto del siNSP5 en la replicación de rotavirus ha sido caracterizado previamente (Rojas, 2004). La inhibición específica de NSP5 da como resultado: 1) disminución en el número y tamaño de viroplasmos, 2) cambios en la distribución normal de varias proteínas virales, 3) reducción en la síntesis de proteína y RNA_v, 4) se reduce la producción de partículas virales purificadas por gradientes de CsCl y 5) producción de dos bandas (A y B) (observadas en gradientes de CsCl) no caracterizadas (Fig. 9 y 10). Por otra parte, el efecto del siNSP5 sobre la transcripción primaria y/o secundaria de rotavirus no ha sido determinado.

Las bandas B1 y B2 (densidad 1.31 y 1.315 respectivamente) (Fig. 9) han sido observadas por microscopía electrónica y se ha determinado que corresponden a partículas mal ensambladas (Brüsow, 1990). Las bandas A y B, producidas en los gradientes de CsCl cuando se bloquea la expresión de NSP5, podrían ser algún tipo de partícula mal ensamblada por las siguientes razones: 1) los gradientes de CsCl 2.37 M no permiten el bandeo de proteína o RNA soluble, 2) estas bandas se encuentran por debajo de las bandas B1 y B2 (Fig. 10), lo que sugiere que tienen una densidad mayor y 3) forman una pastilla en colchones de sacarosa. Al principio se sugirió que las bandas A y B podrían

representar algún tipo de intermediario de replicación; sin embargo a pesar de contener la mayor parte de las proteínas que se encuentran en las TLP's, carecen de la polimerasa viral, VP1, que es característica de los intermediarios de replicación (Fig. 11). Las partículas B1, B2, A y B contienen entre 30 y 60 veces menos RNA que las TLP's o DLP's. A pesar de que la cantidad de RNA detectada fue muy poca ésta fue específica, ya que en las muestras blanco no hubo detección de RNA. Los gradientes de CsCl y los colchones de sacarosa no se realizaron en condiciones libres de RNasas, lo cual sugiere que el RNA detectado por RT-PCR en tiempo real está en el interior de las posibles cápsides, o bien de alguna forma se encuentra asociado a proteína viral, de modo que es protegido de la degradación. La cantidad de RNAm y RNAdc presente en las bandas es muy variable, probablemente esto se deba a su carencia de VP1, una opción, que no excluye la primera, es que en ausencia de NSP5 el empaquetamiento del RNAm sea ineficiente, esta idea surge porque a NSP5 y NSP2 se les ha atribuido la función de empaquetar el RNAm.

En células tratadas con el siNSP5 se reduce la síntesis de proteínas y RNAdc viral; probablemente, por que en ausencia de NSP5 la transcripción del genoma de rotavirus es afectada. Esta hipótesis fue confirmada tras analizar la producción del genoma viral, en este experimento la incorporación de ortofosfato (^{32}P) en los 11 genes de rotavirus disminuye, cuando se interfiere la expresión del gen 11 (Fig. 13). Uno de los resultados esperados era que la reducción en la síntesis del gen 11 fuera mayor a la observada con otros genes, debido a que el RNAm utilizado para la traducción o para la replicación estaría siendo degradado por el sistema RNAi. Los resultados obtenidos apoyan la hipótesis de que existe cierta proporción de los RNAm que se dirigen a hacia la ruta de replicación y otra proporción que se dirigen a la traducción (Dector 2002). Es probable

que existan proteínas virales y/o celulares, que protegen a los RNAm destinados a la replicación y esto podría ser una de las estrategias virales para impedir que los RNAm de rotavirus sean reconocidos y degradados por el sistema de RNAi u otros mecanismos celulares. Otra opción es que el RNAm sea sintetizado en los viroplasma y solo el RNAm destinado a traducción salga de estas estructuras, de modo que es susceptible al sistema de RNAi. En cambio el RNAm destinado a replicación sería protegido en los viroplasma.

En la infección por rotavirus la transcripción primaria es llevada a cabo por las partículas que infectan las células; sin embargo es probable que los RI y/o las DLP's sintetizadas de novo y acumuladas en los viroplasma sintetizen más RNAm, lo que constituiría una transcripción secundaria, similar a la que ocurre en células infectadas con reovirus. Para probar esta idea se realizó una cinética de acumulación de metionina (^{35}S) en proteínas virales. Nosotros demostramos que durante las tres primeras horas post infección la incorporación de metionina (^{35}S) en las proteínas virales permanece constante, y a las cuatro horas post-infección se observa un incremento que se mantiene hasta las 12 horas post infección (Fig. 14 líneas c, 15 barras control). El análisis con RT-PCR del RNAm viral muestra que la síntesis del RNAm es muy baja durante las 3 h.p.i. y que incrementa considerablemente a las 6 y 9 h.p.i. (Fig. 16 barras control). Ambos resultados sugieren la existencia de un segundo ciclo de transcripción que inicia aproximadamente a las 4 h.p.i..

La ausencia de NSP5 afecta la transcripción de rotavirus (Fig. 13), para evaluar si el efecto del siNSP5 es sobre la transcripción secundaria, se realizaron los mismos experimentos mencionados con anterioridad, sólo que en células tratadas con el siNSP5. Durante las primeras 3 h.p.i. no se observa diferencia en la acumulación de metionina (^{35}S) en

proteínas virales o en la cantidad de RNAm de células controles o de células donde la expresión de NSP5 fue bloqueada (Fig. 14 y 16). Durante las primeras horas de infección la síntesis de proteínas y RNAm depende del primer ciclo de transcripción, el cual proviene de las partículas que originalmente entran en la célula. La falta de efecto del siNSP5 en las primeras horas de infección sugiere que la transcripción y traducción primaria son independientes de NSP5. A partir de las 4 h.p.i. se observan diferencias entre células controles y células tratadas con el siNSP5, en estas últimas no se incrementa la acumulación de metionina (^{35}S). Esto sugiere que la inhibición de NSP5 afecta la transcripción secundaria de rotavirus. En células interferidas para NSP5 se reduce la formación y el tamaño de viroplasmos. En los viroplasmos se forman los RI y las DLP's partículas que potencialmente realizan el segundo ciclo de transcripción. Esto puede explicar la inhibición de la transcripción secundaria, ya que al no haber suficientes viroplasmos tampoco se forman suficientes RI's y/o DLP's que generen un segundo ciclo de transcripción. Como el RNAm de rotavirus sirve como templado para la traducción y la replicación, la inhibición del segundo ciclo de transcripción puede explicar la reducción en la síntesis de proteínas y RNAdc de rotavirus.

La proteína NSP5 sufre dos tipos de modificaciones post-traduccionales: 1) la O-glicosilación y 2) la fosforilación. Actualmente no se conoce el papel que juegan estas modificaciones en la función de NSP5. Recientemente se demostró que una CKI recombinante es capaz de fosforilar a NSP5 *in vitro*, por lo que se ha propuesto que en *in vivo* CKI o una enzima similar fosforila a NSP5. En un intento por conocer más acerca de la fosforilación de NSP5, se utilizaron tres inhibidores: IC261, D4476 y H7, los dos primeros inhiben específicamente a CKI *in vivo e in vitro* y el tercero es un inhibidor de

serina/treonina cinasas (entre ellas CKI). Los tres inhibidores provocaron una disminución en las isoformas de 30-34 KDa, que corresponden a las isoformas más fosforiladas de NSP5, (Fig. 17) y en todos los casos aumento ligeramente la isoforma de 26 Kda (Fig. 17). Esto sugiere que CKI está involucrada directa o indirectamente en la fosforilación de NSP5. No podemos descartar la participación de otras cinasas en la fosforilación de NSP5, ya que aún a concentraciones elevadas de cualquiera de los inhibidores, las isoformas de 28 y las 30-34 KDa no desaparecen.

Los resultados de liberación de LDH al medio demuestran que ninguno de los inhibidores tiene efecto tóxico sobre la célula; sin embargo, el IC261 afecta ligeramente la acumulación de metionina (^{35}S) en las proteínas celulares (Fig. 20). Los tres inhibidores tienen diferentes efectos en la acumulación de metionina (^{35}S) en proteínas virales. El IC261 reduce la acumulación de metionina (^{35}S) en proteínas virales, mientras el D4476 la incrementa. El H7 promueve la acumulación de metionina (^{35}S) en proteínas virales durante las primeras horas de infección, pero la reduce a tiempos tardíos. En células tratadas con cualquiera de los inhibidores la producción de progenie viral es reducida. Los resultados obtenidos no nos permiten correlacionar el efecto que tienen los inhibidores sobre la acumulación de metionina (^{35}S) en proteínas virales y la disminución de la fosforilación de NSP5. A pesar de esto resulta interesante determinar la causa del aumento o la disminución en la acumulación de metionina (^{35}S) con cada inhibidor. Particularmente sería interesante saber por qué en células tratadas con D4776, a pesar de haber más proteína viral no aumenta la progenie viral y al contrario disminuye. Es probable que células tratadas con el D4476 las proteínas virales no se ensamblen, o que se ensamblen en partículas que no son infecciosas, quizá por que están vacías.

A pesar de que los inhibidores IC261 y D4476 son específicos para CKI, nosotros hemos observado que reducen la síntesis de proteínas celulares en un 38% y 10% respectivamente. Lo que sugiere que estos inhibidores pueden afectar a otros componentes de la célula, lo cual puede modificar nuestros resultados. Esto apoya la necesidad de montar un mecanismo de complementación fenotípica. Una vez montado este sistema, se podrá realizar la complementación con mutantes de NSP5 que permitan analizar la función de cada dominio. Por ejemplo se podría construir una mutante de NSP5 que no se fosforile, con esto nos evitaríamos el uso de inhibidores.

Conclusiones:

- Las bandas A y B encontradas en los gradientes de CsCl cuando se interfiere NSP5, representan algún tipo de partícula; las bandas B1, B2, A y B tienen poco RNA viral asociado a ellas y carecen de VP1.
- Los resultados presentados sugieren la existencia de un primer ciclo de transcripción independiente de NSP5 y un segundo ciclo de transcripción dependiente de NSP5 y que inicia aproximadamente a las 4 h.p.i.
- La reducción en la fosforilación de NSP5 cuando se trata a las células con diferentes inhibidores de CKI, sugiere que CKI está involucrada directa o indirectamente en la fosforilación de NSP5 in vivo; pero que existen otras cinasas que también podrían fosforilar a NSP5.

Perspectivas

- Identificar por medio de siRNAs cual es la isoforma de CKI que participa en la fosforilación de NSP5.
- Determinar la importancia de la fosforilación NSP5 en la traducción de proteínas virales, replicación, formación de viroplasmos, empaquetamiento del RNAdc y ensamble de partículas virales.
- Utilizar los plásmidos generados para montar la técnica de la complementación fenotípica de células interferidas para NSP5. Utilizando esta técnica, mutagenizar diferentes dominios de la proteína y analizar su función en el ciclo replicativo de rotavirus.

1. Bibliografía

1. Afrikanova, I., Miozzo, M. C., Giambiagi, S. & Burrone, O. (1996). Phosphorylation generates different forms of rotavirus NSP5. *J Gen Virol* 77 (Pt 9), 2059-65.
2. Ball, J. M., Mitchell, D. M., Gibbons, T. F., and Parr, R. D. (2005). Rotavirus NSP4: a multifunctional viral enterotoxin. *Viral Immunol.* 18, 27-40.
3. Bass, B. L. (2001). RNA interference. The short answer. *Nature* 411, 428-9.
4. Baulcombe, D. (2001). RNA silencing. Diced defence. *Nature* 409, 295-6.
5. Barro, M. and Patton, J. T. (2005). Rotavirus nonstructural protein 1 subverts innate immune response by inducing degradation of IFN regulatory factor 3. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102, 4114-4119.
6. Berois, M., Sapin, C., Erk, I., Poncet, D. & Cohen, J. (2003). Rotavirus nonstructural protein NSP5 interacts with major core protein VP2. *J Virol* 77, 1757-63.
7. Blackhall, J., Fuentes, A., Hansen, K. & Magnusson, G. (1997). Serine protein kinase activity associated with rotavirus phosphoprotein NSP5. *J Virol* 71, 138-44.
8. Blackhall, J., Munoz, M., Fuentes, A. & Magnusson, G. (1998). Analysis of rotavirus nonstructural protein NSP5 phosphorylation. *J Virol* 72, 6398-405.
9. Brussow, H., A. Bruttin, and S. Marc-Martin (1990). Polypeptide composition of rotavirus empty capsids and their possible use as a subunit vaccine. *J. Virol.* 64:3635-3642.
10. Campagna, M., Eichwald, C., Vascotto, F. & Burrone, O. R. (2005). RNA interference of rotavirus segment 11 mRNA reveals the essential role of NSP5 in the virus replicative cycle. *J Gen Virol* 86, 1481-7.
11. Caplen, N. J. (2002). A new approach to the inhibition of gene expression. *Trends Biotechnol* 20, 49-51.
12. Caplen, N. J., Parrish, S., Imani, F., Fire, A. & Morgan, R. A. (2001). Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9742-7.
13. Carmichael, G. G. (2002). Medicine: silencing viruses with RNA. *Nature* 418, 379-80.
14. Charpilienne, A., Lepault, J., Rey, F. & Cohen, J. (2002). Identification of rotavirus VP6 residues located at the interface with VP2 that are essential for capsid assembly and transcriptase activity. *J Virol* 76, 7822-31.
15. Chnaiderman Xiao, J., Barro, M. & Spencer, E. (2002). NSP5 phosphorylation regulates the fate of viral mRNA in rotavirus infected cells. *Arch Virol* 147, 1899-911.
16. Ciarlet, M. & Estes, M. K. (2001). Interactions between rotavirus and gastrointestinal cells. *Curr Opin Microbiol* 4, 435-41.
17. Dector, M. A., Romero, P., Lopez, S. & Arias, C. F. (2002). Rotavirus gene silencing by small interfering RNAs. *EMBO Rep* 3, 1175-80.
18. Devroe, E. & Silver, P. A. (2002). Retrovirus-delivered siRNA. *BMC Biotechnol* 2, 15.

19. Donze, O. & Picard, D. (2002). RNA interference in mammalian cells using siRNAs synthesized with T7 RNA polymerase. *Nucleic Acids Res* 30, e46.
20. Eichwald, C., Jacob, G., Muszynski, B., Allende, J. E. & Burrone, O. R. (2004). Uncoupling substrate and activation functions of rotavirus NSP5: phosphorylation of Ser-67 by casein kinase 1 is essential for hyperphosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 16304-9.
21. Estes, M. K. & Cohen, J. (1989). Rotavirus gene structure and function. *Microbiol Rev* 53, 410-49.
22. Fabbretti, E., Afrikanova, I., Vascotto, F. & Burrone, O. R. (1999). Two non-structural rotavirus proteins, NSP2 and NSP5, form viroplasm-like structures in vivo. *J Gen Virol* 80 (Pt 2), 333-9.
23. Gilber, J. M., Feng, N., Patton, J. T. & Greenberg, H. B. (2001). Rotavirus assembly - interaction of surface protein VP7 with middle layer protein VP6. *Arch Virol* 146, 1155-71.
24. Gitlin, L., Karelsky, S. & Andino, R. (2002). Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells. *Nature* 418, 430-4.
25. Gonzalez, R. A., Espinosa, R., Romero, P., Lopez, S. & Arias, C. F. (2000). Relative localization of viroplasmic and endoplasmic reticulum-resident rotavirus proteins in infected cells. *Arch Virol* 145, 1963-73.
26. Gonzalez, R. A., Torres-Vega, M. A., Lopez, S. & Arias, C. F. (1998). In vivo interactions among rotavirus nonstructural proteins. *Arch Virol* 143, 981-96.
27. Gonzalez, S. A. & Burrone, O. R. (1991). Rotavirus NS26 is modified by addition of single O-linked residues of N-acetylglucosamine. *Virology* 182, 8-16.
28. Graff, J. W., Mitzel, D. N., Weisend, C. M., Flenniken, M. L. & Hardy, M. E. Interferon regulatory factor 3 is a cellular partner of rotavirus NSP1. *J. Virol.* 76, 9545-9550 (2002).
29. Gross, S. D. & Anderson, R. A. (1998). Casein kinase I: spatial organization and positioning of a multifunctional protein kinase family. *Cell Signal* 10, 699-711.
30. Hannon, G. J. (2002). RNA interference. *Nature* 418, 244-51.
31. Lepault, J., Petitpas, I., Erk, I., Navaza, J., Bigot, D., Dona, M., Vachette, P., Cohen, J. & Rey, F. A. (2001). Structural polymorphism of the major capsid protein of rotavirus. *Embo J* 20, 1498-507.
32. Li, G., Yin, H. & Kuret, J. (2004). Casein kinase 1 delta phosphorylates tau and disrupts its binding to microtubules. *J Biol Chem* 279, 15938-45.
33. Liu, C., Li, Y., Semenov, M., Han, C., Baeg, G. H., Tan, Y., Zhang, Z., Lin, X. & He, X. (2002). Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* 108, 837-47.
34. Liu, M., Mattion, N. M. & Estes, M. K. (1992). Rotavirus VP3 expressed in insect cells possesses guanylyltransferase activity. *Virology* 188, 77-84.
35. Lopez, S. & Arias, C. F. (2004). Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. *Trends Microbiol* 12, 271-8.
36. Lopez, S. y. A. C. (2003). Los rotavirus En <http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/cap17/>.
37. Lopez, T., Camacho, M., Zayas, M., Najera, R., Sanchez, R., Arias, C. F. & Lopez, S. (2005a). Silencing the morphogenesis of rotavirus. *J Virol* 79, 184-92.

38. Lopez, T., Rojas, M., Ayala-Breton, C., Lopez, S. & Arias, C. F. (2005b). Reduced expression of the rotavirus NSP5 gene has a pleiotropic effect on virus replication. *J Gen Virol* 86, 1609-17.
39. Mashhoon, N., DeMaggio, A. J., Tereshko, V., Bergmeier, S. C., Egli, M., Hoekstra, M. F. & Kuret, J. (2000). Crystal structure of a conformation-selective casein kinase-1 inhibitor. *J Biol Chem* 275, 20052-60.
40. 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.
41. Mirazimi, A., Magnusson, K. E. & Svensson, L. (2003). A cytoplasmic region of the NSP4 enterotoxin of rotavirus is involved in retention in the endoplasmic reticulum. *J Gen Virol* 84, 875-83.
42. Mohan, K. V., Muller, J., Som, I. & Atreya, C. D. (2003). The N- and C-terminal regions of rotavirus NSP5 are the critical determinants for the formation of viroplasm-like structures independent of NSP2. *J Virol* 77, 12184-92.
43. Nilsson, M., von Bonsdorff, C. H., Weclawicz, K., Cohen, J. & Svensson, L. (1998). Assembly of viroplasm and virus-like particles of rotavirus by a Semliki Forest virus replicon. *Virology* 242, 255-65.
44. Padilla-Noriega, L., Paniagua, O. & Guzman-Leon, S. (2002). Rotavirus protein NSP3 shuts off host cell protein synthesis. *Virology* 298, 1-7.
45. Patton, J. T. (1995). Structure and function of the rotavirus RNA-binding proteins. *J Gen Virol* 76 (Pt 11), 2633-44.
46. Patton, J. T. (2001). Rotavirus RNA replication and gene expression. *Novartis Found Symp* 238, 64-77; discussion 77-81.
47. Patton, J. T., Jones, M. T., Kalbach, A. N., He, Y. W. & Xiaobo, J. (1997). Rotavirus RNA polymerase requires the core shell protein to synthesize the double-stranded RNA genome. *J Virol* 71, 9618-26.
48. Patton, J. T. & Spencer, E. (2000). Genome replication and packaging of segmented double-stranded RNA viruses. *Virology* 277, 217-25.
49. Patton, J. T., Wentz, M., Xiaobo, J. & Ramig, R. F. (1996). cis-Acting signals that promote genome replication in rotavirus mRNA. *J Virol* 70, 3961-71.
50. Pesavento, J. B., Lawton, J. A., Estes, M. E. & Venkataram Prasad, B. V. (2001). The reversible condensation and expansion of the rotavirus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1381-6.
51. Piron, M., Vende, P., Cohen, J. & Poncet, D. (1998). Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4GI and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F. *Embo J* 17, 5811-21.
52. Ramig, R. F. (2004). Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *J Virol* 78, 10213-20.
53. Ramig, R. F. & Petrie, B. L. (1984). Characterization of temperature-sensitive mutants of simian rotavirus SA11: protein synthesis and morphogenesis. *J Virol* 49, 665-73.
54. Rena, G., Bain, J., Elliott, M. & Cohen, P. (2004). D4476, a cell-permeant inhibitor of CK1, suppresses the site-specific phosphorylation and nuclear exclusion of FOXO1a. *EMBO Rep* 5, 60-5.

55. Rojas, M. (2004a). Inhibición de la expresión del gen 11 de rotavirus por medio de siRNAs. In Facultad de Ciencias/UNAM. México, D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México.
56. Rojas, M., López, T., López, S., Arias, C.F. (2004b). Inhibición de la síntesis de la proteína NSP5 de Rotavirus por RNAi. In III Congreso Nacional de Virología. Morelia, Michoacán, México.
57. Schuck, P., Taraporewala, Z., McPhie, P. & Patton, J. T. (2001). Rotavirus nonstructural protein NSP2 self-assembles into octamers that undergo ligand-induced conformational changes. *J Biol Chem* 276, 9679-87.
58. Silvestri, L. S., Taraporewala, Z. F. & Patton, J. T. (2004). Rotavirus replication: plus-sense templates for double-stranded RNA synthesis are made in viroplasm. *J Virol* 78, 7763-74.
59. Taraporewala, Z., Chen, D. & Patton, J. T. (1999). Multimers formed by the rotavirus nonstructural protein NSP2 bind to RNA and have nucleoside triphosphatase activity. *J Virol* 73, 9934-43.
60. Torres-Vega, M. A. (2000). Estudio sobre las asociaciones intermoleculares de la proteína NSP5 de los rotavirus. In Instituto de Biotecnología. Cuernavaca, Morelos, México: UNAM.
61. Torres-Vega, M. A., Gonzalez, R. A., Duarte, M., Poncet, D., Lopez, S. & Arias, C. F. (2000). The C-terminal domain of rotavirus NSP5 is essential for its multimerization, hyperphosphorylation and interaction with NSP6. *J Gen Virol* 81, 821-30.
62. Vasquez, M., Sandino, A. M., Pizarro, J. M., Fernandez, J., Valenzuela, S. & Spencer, E. (1993). Function of rotavirus VP3 polypeptide in viral morphogenesis. *J Gen Virol* 74 (Pt 5), 937-41.
63. Vende, P., Taraporewala, Z. F. & Patton, J. T. (2002). RNA-binding activity of the rotavirus phosphoprotein NSP5 includes affinity for double-stranded RNA. *J Virol* 76, 5291-9.
64. Vende, P., Tortorici, M. A., Taraporewala, Z. F. & Patton, J. T. (2003). Rotavirus NSP2 interferes with the core lattice protein VP2 in initiation of minus-strand synthesis. *Virology* 313, 261-73.
65. Xu, A., Bellamy, A. R. & Taylor, J. A. (2000). Immobilization of the early secretory pathway by a virus glycoprotein that binds to microtubules. *Embo J* 19, 6465-74.
66. Zeng, C. Q., Labbe, M., Cohen, J., Prasad, B. V., Chen, D., Ramig, R. F. & Estes, M. K. (1994). Characterization of rotavirus VP2 particles. *Virology* 201, 55-65.
67. Zhang, M., Zeng, C. Q., Morris, A. P. & Estes, M. K. (2000). A functional NSP4 enterotoxin peptide secreted from rotavirus-infected cells. *J Virol* 74, 11663-70.