



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA DEL  
DESARROLLO Y FISIOLÓGIA MOLECULAR

**ELEMENTOS QUE DEFINEN Y REGULAN LA  
FUNCIÓN DEL RNA MENSAJERO DE ROTAVIRUS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
**DOCTOR EN CIENCIAS**

P R E S E N T A :

**Camilo Ayala Bretón**

DIRECTOR DE TESIS: Dra. Susana López Charretón



Cuernavaca, Morelos

Octubre 2009



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

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

## Agradecimientos

- A mis padres Virginia y Camilo.
- A mi tía Guadalupe.
- A mis hermanos Alberto y Odín.
  
- A mi tutora la Dra. Susana López Charretón.
- A mi comité tutorial:
  - Dr. José Luís Puente García
  - Dr. Luís Padilla Noriega
  - Dra. Tzevetanka Dimitrova Dinkova
  - Dr. Lorenzo Segovia Forcella
- Al Dr. Juan Enrique Morett Sánchez
- Al Dr. José Luís Reyes Taboada
- Al Dr. Félix Recillas Targa
  
- A mis compañeros del laboratorio.

# Índice

<i>Resumen</i>	1
<i>Abstract</i>	2
<i>Introducción</i>	3
<i>Objetivos</i>	12
<i>Hipótesis</i>	12
<i>Materiales y métodos</i>	13
<i>Resultados</i>	24
<i>Discusión</i>	38
<i>Conclusiones</i>	47
<i>Perspectivas</i>	48
<i>Bibliografía</i>	49
<i>Anexo</i>	53

## Resumen

Los rotavirus pertenecen a la familia *Reoviridae*. Las partículas virales están formadas por tres capas concéntricas de proteínas, en su interior se encuentra el genoma viral, el cual consiste en 11 segmentos de RNA de doble cadena. Debido a la presencia de una RNA polimerasa dependiente de RNA, la partícula viral puede producir varias rondas de mRNA. En este trabajo se investigó la importancia de las proteínas virales VP1, VP2, VP3 y VP6 en los diferentes procesos del ciclo replicativo del virus. Se encontró que al inhibir la expresión de estas proteínas mediante siRNA, la formación de partículas infecciosas así como la replicación y la transcripción virales se veían disminuidas. En una investigación más detallada, se encontró que en ausencia de VP1 y VP3 se formaban partículas virales de baja densidad, indicando que la ausencia de estas proteínas no afecta el ensamble del virus. Por otra parte, la traducción viral únicamente se veía afectada cuando VP2 ó VP6 eran silenciadas, mientras que el co-silenciamiento de VP1-VP6 produjo un incremento en la traducción de proteínas virales comparado con los niveles de traducción viral obtenidos al silenciar únicamente a VP6, esto indica que VP1 pudiera estar afectando la traducción viral. El co-silenciamiento de VP1-VP2 no produjo una recuperación en la traducción de proteínas virales quizá debido a que, como se encontró en este trabajo, VP2 es importante para la estabilidad del mRNA viral, por lo que en ausencia de esta proteína el mRNA viral es degradado con mayor rapidez.

Un estudio más detallado de la regulación de la función del mRNA viral por parte de las proteínas virales asociadas a éste se realizó al cuantificar el mRNA viral asociado a las proteínas virales con capacidad de asociarse al RNA. Se encontró que la mayoría del mRNA viral se encontraba asociado a las proteínas virales que participan en el proceso de replicación viral. Asimismo, se encontró una correlación entre la replicación viral y la formación del complejo VP1 – mRNA viral, ya que al silenciar a la proteína viral NSP3, tanto la replicación viral como la cantidad de mRNA viral unido a VP1 aumentaron tres veces. El aumento en la cantidad de mRNA asociado a VP1 no es una consecuencia del aumento en la replicación y transcripción virales, sino la causa. Finalmente, se encontró que el mRNA viral asociado a VP1, al igual que el mRNA viral que es utilizado como templado para la replicación viral, no es susceptible a la degradación inducida por la RNAi sugiriendo que VP1 selecciona a los mRNAs que serán replicados.

## Abstract

Rotaviruses are non-enveloped viruses belonging to the *Reoviridae* family. The virions consist of three concentric protein layers surrounding the viral genome, which consists of eleven double stranded RNA segments. Once in the cellular cytoplasm, the viral particles can produce several rounds of mRNA synthesis due to the inner viral RNA-dependent RNA polymerase. In this work the importance of the structural proteins VP1, VP2, VP3, and VP6 in different viral processes was analyzed. Silencing the expression of each one of these proteins by using interfering RNA resulted in an important decrease of the replication and transcription of the viral genome. Low-density viral particles could be assembled in cells expressing low levels of VP1 and VP3, suggesting that these two proteins were not important in virus morphogenesis. On the other hand, viral translation was affected only when the translation of VP2 or VP6 was abolished by RNAi whereas silencing VP1 and VP3 did not affect the viral translation. Further experiments showed that co-silencing VP1–VP6 partially restored viral translation, suggesting that VP1 could be involved in a negative regulation of the viral translation, moreover VP2 is important for viral mRNA stability and perhaps for this reason, VP1-VP2 co-silencing did not restore the translation of viral proteins.

A more detailed study of the regulatory role of viral proteins on viral mRNA function was done by a quantification of the viral mRNA associated to RNA-binding viral proteins. The results showed that most of the viral mRNA is associated to viral proteins involved in the replication process. Furthermore, since silencing of the viral protein NSP3 resulted in a three times increase of both viral replication and mRNA associated to VP1, probably a correlation between viral replication and the formation of VP1–mRNA complex exists. Finally, the viral mRNA associated to VP1 as well as the mRNA used as a template for the viral replication, it is not susceptible to RNAi-mediated degradation suggesting that the VP1–associated mRNA is the mRNA used as template for viral replication.

## Introducción

Los rotavirus, pertenecientes a la familia Reoviridae, son la principal causa de gastroenteritis en los niños menores de dos años en todo el mundo. Estos virus infectan los enterocitos maduros de las vellosidades del intestino delgado y provocan diarrea severa, llegando a causar la muerte por deshidratación, sobre todo en niños de países subdesarrollados. Anualmente 500,000 niños mueren a causa de rotavirus<sup>1</sup>. Además de infectar a humanos, se han podido aislar cepas de rotavirus presentes en bovinos, equinos, porcinos, caninos, entre otros<sup>2</sup>.

Las partículas maduras de este virus miden aproximadamente 1000 Å y están formadas por tres capas concéntricas de proteínas, con una simetría característica<sup>3</sup>. La primera capa del virus está compuesta por 60 moléculas de la proteína VP2 en forma de pentámeros y en su interior se encuentran los 11 segmentos del genoma en forma de RNA de doble cadena y 12 copias de las proteínas VP1 y VP3 (a este tipo de partícula viral se le conoce como core). La segunda cubierta consiste de 780 moléculas de VP6, que es la proteína viral más abundante; la partícula viral que posee estas dos capas es llamada partícula de doble capa (DLP por sus siglas en inglés: Double-Layered Particle). La capa más externa consiste de 260 trímeros de VP7 y 60 espículas formadas por la proteína VP4, formándose las partículas de tres capas (TLP: Triple-Layered Particle)<sup>4</sup>.

El genoma de rotavirus consiste en 11 segmentos de RNA de doble cadena (dsRNA) que codifican para 6 proteínas estructurales (VP1-4, VP6 y VP7) y 6 no estructurales (NSP1-6). Por convención, a la cadena de RNA viral con la misma polaridad que el RNA mensajero (mRNA) se le conoce como cadena positiva (RNA+) y a la complementaria se le conoce como cadena negativa (RNA-)<sup>5</sup>.

## **Entrada**

La TLP es la única partícula viral de rotavirus que es infecciosa ya que las proteínas que forman la capa externa son responsables de la unión y penetración del virus a la célula hospedera<sup>5</sup>. La infección de rotavirus depende del corte proteolítico de la proteína VP4 por tripsina<sup>6</sup>, el cual genera dos nuevos polipéptidos de menor peso molecular: VP5 y VP8<sup>7</sup>, que son necesarios para la interacción del virus con los receptores celulares.



La primera interacción de la cepa del rotavirus de simio RRV (Rhesus Rotavirus) con la célula es con ácidos siálicos, ya que tratamientos con neuraminidasa (enzima que corta los residuos de ácido siálico), disminuyen drásticamente la unión del virus<sup>8</sup>. Sin embargo, se ha reportado la existencia de otras cepas de rotavirus cuya infectividad no se afecta por los tratamientos con neuraminidasa<sup>9</sup>; a estas cepas se les conoce como neuraminidasa-resistentes. La primera interacción con los ácidos siálicos se lleva a cabo mediante la proteína viral VP8<sup>9</sup>.

El siguiente paso en la entrada de la cepa RRV, es la unión de VP5 con la integrina  $\alpha 2\beta 1$ <sup>10</sup>. Posteriormente, se dan una serie de interacciones entre el virus y otros receptores celulares: VP7 interactúa con las integrinas  $\alpha v\beta 3$ <sup>11</sup> y  $\alpha x\beta 2$ <sup>10</sup>, mientras que VP5 se une a la proteína hsc70<sup>12</sup>, aunque se desconoce si hay secuencialidad en estas interacciones.

La vía de entrada de esta cepa a las células MA104 aun no se conoce, sin embargo, se sabe que el mecanismo no es vía endocitosis mediada por clatrina como anteriormente se había sugerido<sup>13</sup> ni por endocitosis mediada por caveolas. Una caracterización más detallada del proceso de entrada de rotavirus mostró que la cepa RRV necesita de dominios ricos en colesterol y esfingolípidos (balsas lipídicas) para poder entrar a las células MA104<sup>14</sup>. Otra de las moléculas necesarias para la entrada de rotavirus es la proteína dinamina, la cual participa en varios procesos como fagocitosis y endocitosis independiente de clatrina y caveolina, lo cual podría indicar que rotavirus entra a las células mediante un mecanismo aun no caracterizado<sup>14</sup>.

### ***Ciclo replicativo***

Al entrar a la célula, la partícula viral pierde la capa externa de proteínas y como una DLP, es capaz de producir mRNA viral durante varias rondas<sup>15,16</sup>, ya que contiene a los 11 segmentos del genoma viral, cada uno asociado a una copia de la RNA polimerasa dependiente de RNA y la enzima encargada de poner el cap en el mRNA, VP3<sup>17,18</sup>.

Los mRNAs virales tienen cap en su extremo 5' pero, a diferencia de la mayoría de los RNA mensajeros celulares, carecen de poli(A) en su extremo 3' y en su lugar todos ellos terminan con la secuencia consenso GACC-3'<sup>19</sup>. Los transcritos virales, además de funcionar como mensajeros para la síntesis de las proteínas virales, sirven como templado para la síntesis de la cadena negativa (replicación).

Durante las primeras horas de la infección viral, las proteínas virales VP1, VP2, VP3, NSP2, NSP5 y NSP6, comienzan a acumularse en estructuras perinucleares electrodenudas conocidas como viroplasmos, estas estructuras pueden visualizarse mediante microscopía electrónica o inmunofluorescencia desde las 2 – 3 horas post-infección<sup>20, 21</sup>. Estos viroplasmos son ricos en RNA y proteínas virales, por lo que se ha propuesto que la replicación del genoma viral y el ensamblaje de las partículas virales (a excepción de las TLPs) se llevan a cabo en estas estructuras. Aunque se desconoce como se lleva a cabo la incorporación de las proteínas virales a estos viroplasmos, se sabe que las proteínas NSP2 y NSP5 pueden formar estructuras muy similares a los viroplasmos<sup>22</sup>, por lo que se ha propuesto que estas proteínas son la base de los viroplasmos.

Las funciones de las proteínas virales durante la infección son muy diversas, ya que además de servir para la formación de las partículas virales, son importantes para inhibir la traducción de los mRNAs celulares y también participan en la replicación y transcripción virales. A continuación, se describe brevemente la función conocida de cada una de las proteínas virales que participan en el ciclo replicativo:

## **VP1**

Es una proteína estructural de aproximadamente 125 kD; el RNA que codifica para esta proteína tiene 3302 nt y es el gen más grande de este virus. VP1 tiene actividad de RNA polimerasa dependiente de RNA<sup>23</sup> y necesita de la proteína VP2 para su actividad<sup>24</sup>. Esta proteína se une de forma dependiente de secuencia al extremo 3' de los mRNAs virales<sup>25</sup> y forma parte de los intermediarios de replicación<sup>26</sup>. Se sabe que interactúa con las proteínas virales VP2, VP3 y NSP2<sup>27</sup>.

## **VP2**

Es una proteína estructural de 102 kD, el mRNA que la codifica tiene 2690 nt. Es el componente principal de los cores virales<sup>28</sup>. Tiene afinidad específica tanto por el RNA de cadena sencilla como por el dsRNA<sup>29</sup>. Es primordial en la formación de los intermediarios de replicación ya que ayuda a la incorporación de NSP2 al complejo de replicación mediante una interacción con NSP5<sup>30</sup>, su dominio N-terminal está involucrado en la encapsidación de VP1, VP3 y del genoma viral<sup>31</sup>.

## **VP3**

Esta proteína es de 98 kD y su mRNA tiene 2591 nt. Es la guanilil-metil transferasa viral, es decir, la enzima encargada de colocar el cap en el extremo 5' de los mRNAs virales conforme se van sintetizando<sup>17, 18</sup>. Se une al RNA de cadena sencilla de forma no específica, aunque se cree que tiene mayor afinidad por el extremo 5' de los RNAs<sup>32</sup>. Se encontró que in vitro, VP3 no es necesaria para la replicación del genoma<sup>33</sup>.

## **VP6**

Pesa aproximadamente 48 kD y es traducida a partir del segmento 6 (1356 nt) del genoma viral. Forma la capa intermedia de la partícula viral; debido a esto interactúa con las proteínas virales que conforman a la TLP y el core (VP4, VP7; y VP2, respectivamente)<sup>34</sup>. Se acumula principalmente en los viroplasmos<sup>20</sup> y no interactúa con ningún tipo de RNA. Es necesaria para la transcripción viral, pero no para la replicación<sup>28, 35</sup>. Es por ello que únicamente las DLPs son capaces de transcribir el mRNA viral, el cual sale de la partícula viral a través de los canales formados por esta proteína, adyacentes a los vértices del core viral<sup>36</sup>.

## **NSP2**

La proteína NSP2 pesa 36 kD, y el mRNA que la codifica es de 1059 nt. Como se mencionó anteriormente, esta proteína junto con NSP5, forma la estructura básica de los viroplasmos<sup>22</sup>. NSP2 forma parte de los intermediarios de replicación, tiene afinidad por el RNA de cadena sencilla, desestabiliza las estructuras secundarias del mRNA viral y tiene actividad NTPasa<sup>37</sup>. Por todo esto, se ha propuesto que sirve como 'motor molecular' para permitir el paso del RNA del exterior de la partícula hacia su interior durante la replicación. Interactúa con VP1 y NSP5<sup>27, 38</sup>.

## **NSP3**

NSP3 pesa 34kD y el mRNA correspondiente es de 1105 nucleótidos. Esta proteína se asocia de forma secuencia específica al extremo 3' de los mRNAs virales, exactamente en las últimas 4 bases (GACC) y se ha observado que este sitio de unión está dentro de la secuencia que reconoce VP1<sup>39</sup>. NSP3 es la proteína viral encargada de inhibir la traducción de proteínas celulares durante la infección, posiblemente mediante un secuestro de los factores de inicio de la traducción, ya que NSP3 interactúa con el factor eIF4G1 en el mismo sitio donde PABP se une a este factor de traducción

celular<sup>40, 41</sup>. Debido a su interacción con eIF4G1 y con el mRNA viral, se había propuesto que era importante para la traducción de proteínas virales, sin embargo, el inhibir la traducción de NSP3 mediante siRNAs no afecta la traducción del resto de las proteínas virales durante la infección<sup>40, 42</sup>.

## **NSP4**

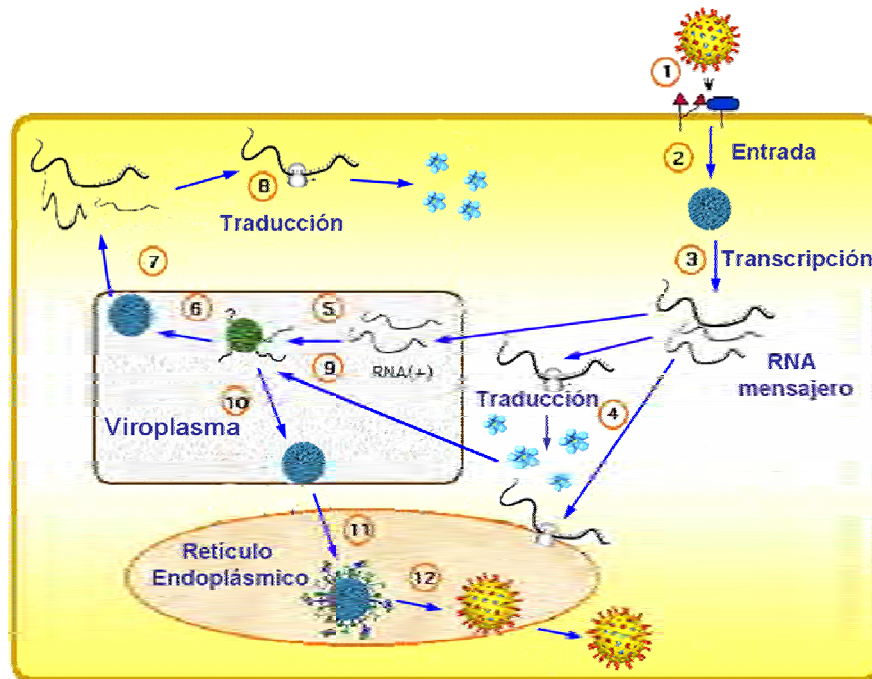
Esta es una proteína N-glicosilada con residuos de alta manosa que se distribuye en la membrana del retículo endoplásmico<sup>5, 43</sup>. Pesa 20 kD y se transcribe a partir del mRNA del gen 10 (751 nt). Debido a su localización intracelular y a su interacción con la VP6, esta proteína sirve como receptora de las DLPs durante su migración hacia el lumen del retículo endoplásmico<sup>44</sup>. Si bien no es necesaria para el proceso de replicación del genoma, su ausencia afecta el proceso de migración de las DLPs hacia el retículo, provocando que éstas se acumulen en el citoplasma; lo que trae como resultado un aumento en la acumulación de transcritos virales<sup>45</sup> y la disminución severa en la formación de partículas virales maduras.

## **NSP5**

Las modificaciones post-traduccionales de esta proteína son O-glicosilación<sup>46</sup> y fosforilación, las cuales dan origen a productos de 28 y 32-34 kD<sup>38, 47</sup>. Forma parte de los intermediarios de replicación e interactúa con VP1, VP2, NSP2 y NSP6<sup>38</sup>. Se une al RNA de forma no específica<sup>48</sup>. Al igual que NSP2, es una proteína marcadora de viroplasmos y es necesaria para la replicación viral<sup>49</sup>.

## ***Replicación viral***

La elucidación de la participación de estas proteínas en el ciclo replicativo de rotavirus se ha logrado mediante análisis de la unión del RNA viral con las proteínas virales, mediante el uso de mutantes termosensibles y, recientemente, con el uso de siRNAs. En base a los resultados obtenidos se ha propuesto un modelo de replicación viral<sup>34</sup>, el cual se explica en la ilustración 1:



**Ilustración 1.** La partícula viral de tres capas se une a sus receptores celulares ① y, mediante un mecanismo aun no bien caracterizado, entra a la célula ②. Durante, o inmediatamente después de llegar al citoplasma celular, el virus pierde la tercera capa de proteínas y queda como una DLP, capaz de producir mRNA viral durante varias rondas ③. Este mRNA puede ser utilizado para la traducción de las diferentes proteínas virales, las cuales pueden localizarse en el citoplasma o asociadas al retículo endoplásmico ④. El mRNA viral también puede utilizarse como templado para la replicación viral, la cual se lleva a cabo en los cores virales, los cuales se localizan dentro de los viroplasmos ⑤. Los cores ensamblados dentro de la célula pueden adquirir la segunda capa de proteínas y formar una DLP ⑥, la cual es capaz de producir más mRNA viral ⑦ para ser utilizado para la traducción ⑧ o replicación ⑨. Finalmente, las DLPs pueden migrar hacia el retículo endoplásmico ⑩, en donde adquieren una capa de transitoria de lípidos ⑪ y la tercera capa de proteínas virales, para dar origen a un virus maduro capaz de infectar otras células ⑫.

Como se mencionó anteriormente, la replicación viral se lleva a cabo en el interior de los cores virales, conformados principalmente por la proteína VP2. Si bien no se conoce con exactitud el proceso de selección de los mRNAs virales que serán replicados, se cuenta con información de los complejos RNA – proteína formados durante este proceso: Inicialmente, el mRNA viral se asocia con las proteínas VP1 y VP3 para formar un intermediario de replicación (pre-core). Interacciones subsecuentes con VP2, NSP2 y NSP5, crean un segundo intermediario de replicación, con los 11

segmentos del RNA viral asociados al exterior del core viral. Se desconoce si primero se forma el core y luego se asocia el mRNA o, si por el contrario, los 12 vértices del core se forman de forma independiente y posteriormente se ensamblan en una partícula. Cuando los 11 segmentos de mRNA viral están asociados a la partícula, la replicación puede comenzar. Este proceso se lleva a cabo conforme el mRNA viral se introduce al core, con ayuda de las proteínas no estructurales, a medida que los 11 segmentos entran se van replicando hacia el interior en forma simultánea. Una vez que se ha completado la replicación, las proteínas no estructurales se disocian y se forma el core viral.

Durante el proceso de replicación, VP6 se asocia a este core, dando como resultado la formación de una partícula viral con dos capas de proteínas (DLP). Esta partícula es transcripcionalmente activa y tiene la capacidad de producir varias rondas de mRNA viral y/o migrar hacia el retículo endoplásmico donde se completa su maduración.

Al inicio de la infección, todo el mRNA viral producido proviene de la partícula viral que infectó a la célula. Se ha propuesto que las primeras DLPs ensambladas dentro de la célula en las fases tempranas de la infección son competentes para producir más RNA mensajero y por lo tanto se acumula una mayor cantidad de mRNA viral; a esto se le conoce como segundo ciclo de transcripción y, aunque ha sido propuesto en varias revisiones, no ha sido formalmente demostrado<sup>5</sup>.

Como se ha mencionado, una vez ensambladas, las DLPs migran hacia el lumen del retículo endoplásmico, mediante una interacción entre VP6 y NSP4. En la membrana del retículo endoplásmico se encuentra además de NSP4 la glicoproteína VP7, mientras que VP4 se localiza entre los viroplasmos y el exterior del retículo endoplásmico<sup>21</sup>. Durante el paso hacia el interior del RE la partícula viral adquiere una capa transitoria de lípidos en el que se encuentran VP7 y NSP4<sup>5, 50</sup>.

La morfogénesis viral termina cuando, mediante un proceso aun no bien caracterizado, VP4 y VP7 se ensamblan en la partícula viral y la capa transitoria de lípidos se pierde. Aun cuando se sabe que VP7 participa en este paso, el proceso mediante el cual VP4 y VP7 se ensamblan en la partícula y se pierde la capa de lípidos junto con NSP4 sigue siendo desconocido<sup>51</sup>. El resultado final es un virus maduro, el cual contiene los componentes necesarios para infectar a las células.

Aun cuando se sabe que algunas proteínas de rotavirus interactúan con el RNA viral<sup>32</sup>, se desconoce la forma en que estas proteínas participan en los procesos

relacionados con la replicación: desde la selección de los mensajeros que serán replicados, hasta el papel que juegan en la estabilidad de los mRNA virales.

Para investigar la función de algunas proteínas virales en la replicación, se han implementado ensayos de replicación *in vitro*. En estos ensayos se utilizaron proteínas recombinantes para poder encontrar las proteínas mínimas necesarias para poder replicar un RNA con las secuencias virales. Se encontró que VP1 y VP2 son suficientes para replicar un RNA con las características de los transcritos de rotavirus<sup>52</sup>. Sin embargo, el problema que representan estos ensayos es que el RNA no es encapsidado, por lo tanto no necesariamente reflejan lo que está sucediendo *in vivo*.

Por otro lado, otra estrategia que se ha utilizado para estudiar la función de las proteínas virales ha sido la caracterización de mutantes termosensibles, al estudiar los fenotipos obtenidos durante una infección con estos virus a temperaturas no permisivas, se confirmó que VP1 y VP2 eran necesarias para la replicación y además se encontró que la proteína VP3 también era importante para la replicación viral<sup>53</sup>. Este resultado fue inesperado ya que como se mencionó, VP3 es la metil-guanilil transferasa y por lo tanto se pensaba que su actividad solo era necesaria en el proceso de transcripción del dsRNA viral<sup>17, 19</sup>.

Al caracterizar el fenotipo de un virus termosensible con una lesión en VP6 se encontró que a 37° C, la transcripción disminuía 20 veces mientras que la replicación únicamente dos veces, sugiriendo que VP6 era necesaria únicamente para la transcripción y no para la replicación viral<sup>36</sup>.

Estos resultados fueron obtenidos mediante el uso de mutantes termosensibles, y existe la posibilidad de que esas proteínas pudieran tener otras funciones que no fueron afectadas por las mutaciones presentes ya que se caracterizaron un número limitado de mutantes.

En los últimos años, el papel de las proteínas virales durante el ciclo replicativo de rotavirus se ha estudiado utilizando como herramienta el silenciamiento de la expresión génica mediante RNA de interferencia (RNAi), en el cual se dirige la degradación específica de un determinado mRNA, evitando así su traducción. La RNAi es altamente específica y funciona en células en cultivo, por lo que se ha utilizado como una herramienta para bloquear específicamente la traducción de ciertas proteínas virales y celulares y obtener así más información acerca de su función<sup>54</sup>. Gracias a la RNAi, en el laboratorio se ha podido estudiar la función de casi todas las proteínas virales, así como de algunas proteínas celulares, en el ciclo replicativo de rotavirus<sup>49, 51, 42, 55</sup>.

Es interesante notar que el estudio de las proteínas virales mediante RNAi ha ofrecido resultados muy distintos a los obtenidos anteriormente mediante ensayos in vitro. Por ejemplo, en ensayos de traducción in vitro y en líneas celulares estables que expresan a NSP3<sup>56</sup>, se observó que esta proteína podría estar participando en la traducción de los mRNAs virales ya que NSP3 se une al extremo 3' de los RNAs virales y al factor de inicio de la traducción eIF4G, en el mismo sitio donde se une la proteína celular PABP<sup>40</sup>, inhibiendo la traducción de los RNAs mensajeros celulares<sup>44</sup> y promoviendo la traducción de los mRNAs virales. Sin embargo, en células infectadas, NSP3 parece no ser necesaria para la traducción de los mRNAs virales, ya que al silenciar la expresión de esta proteína mediante RNA de interferencia, no se encontraron diferencias entre la cantidad de proteína viral sintetizada en ausencia de NSP3 comparado con los niveles de proteínas virales traducidas en una infección control<sup>42</sup>.

Las diferencias obtenidas en este ejemplo sugieren que es importante estudiar el papel de las proteínas en el contexto de una infección, donde la cantidad de cambios que ocurren en la célula durante el proceso infeccioso, podría afectar de manera positiva o negativa el papel de las proteínas virales.

Por estas razones, el objetivo de este trabajo fue el de estudiar el papel de las proteínas virales en los procesos de replicación y traducción durante la infección. Para ello, las proteínas que integran al core y a la DLP (partículas donde se llevan a cabo los procesos de replicación y transcripción, respectivamente) fueron silenciadas utilizando el sistema de RNA de interferencia y se analizaron los efectos de la ausencia de estas proteínas en la replicación y traducción virales. Asimismo, se estudió la interacción de las proteínas virales con los RNAs del virus de manera cuantitativa y se investigó si había correlación entre la cantidad de mRNA viral asociado a VP1 y la replicación viral.



# Objetivos

## ***General***

- Estudiar la participación de algunas de las proteínas virales de rotavirus en los procesos de replicación y traducción del RNA viral.

## ***Particulares***

- Estandarizar un método para la cuantificación del mRNA y dsRNA de los diferentes genes de rotavirus.
- Determinar la cinética de acumulación de mRNA y dsRNA virales durante el ciclo replicativo viral.
- Estudiar la importancia de las proteínas que integran a las DLPs (VP1, VP2, VP3 y VP6) en el ciclo replicativo del virus.
- Determinar si existe una relación entre la cantidad de RNA unido a las proteínas VP1 y NSP3 y los niveles de replicación y traducción virales.

## **Hipótesis**

1. Las proteínas que forman el core del virus (VP1, VP2 y VP3) son necesarias para la replicación del genoma, mientras que la proteína VP6 sólo es importante para la transcripción.
2. La inhibición en la replicación viral tiene como consecuencia una disminución en la transcripción viral y, por lo tanto, la traducción de proteínas virales se verá disminuida.
3. Existe una relación entre la cantidad de RNA unido a VP1 y el nivel de replicación viral pero no hay una relación entre el RNA que se une a NSP3 y el nivel de traducción viral.

## Materiales y métodos

### *Células y virus*

Células MA104 (provenientes de riñón del mono Rhesus) fueron utilizadas para todos los experimentos. El medio de cultivo utilizado para crecer las células fue Eagle's minimal essential médium (MEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino.

La cepa viral utilizada para la mayoría de los experimentos fue RRV (Rhesus Rotavirus) y obtenida de H. B. Greenberg (Stanford University, Stanford, CA); la cepa viral SA11 se obtuvo de H. H. Malherbe y la cepa de rotavirus YM se aisló en el laboratorio.

### *Anticuerpos*

Los anticuerpos utilizados en este trabajo fueron los siguientes:

<b>Nombre</b>	<b>Origen, tipo de anticuerpo</b>	<b>Dirigido contra</b>	<b>Fuente</b>
3A8	Ratón, Monoclonal	VP2	H. B. Greenberg
255/60	Ratón, Monoclonal	VP6	H. B. Greenberg
B4	Ratón, Monoclonal	NSP4	H. B. Greenberg
HS2	Ratón, Monoclonal	VP4	H. B. Greenberg
$\alpha$ TLP's	Conejo, Policlonal	Proteínas estructurales de Rotavirus.	Producido en el laboratorio
$\alpha$ Vimentina	Conejo, Policlonal	Vimentina	Producido en el laboratorio
$\alpha$ VP1	Conejo, Policlonal	VP1	Producido en el laboratorio
$\alpha$ NSP2	Conejo, Policlonal	NSP2	Producido en el laboratorio
$\alpha$ NSP3	Conejo, Policlonal	NSP3	Producido en el laboratorio
$\alpha$ DIG	Oveja, Fab-PO	Digoxigenina	Molecular Probes (Eugene, OR)
Alexa-488	Cabra, Policlonal conjugado a Alexa-488	IgG de ratón o conejo	Molecular Probes (Eugene, OR)
Alexa-647	Cabra, Policlonal conjugado a Alexa-647	IgM de ratón o IgG de conejo	Molecular Probes (Eugene, OR)
$\alpha$ Conejo-PO	Cabra, Policlonal acoplado a peroxidasa de rábano	IgG conejo	Perkin Elmer life Sciences (Boston MA)
$\alpha$ Ratón-PO	Cabra, Policlonal acoplado a peroxidasa de rábano	IgG ratón	Zymed (San Francisco, CA)

## ***PCR en tiempo real***

Los oligonucleótidos para PCR fueron diseñados utilizando el software Primer 3 del MIT ([http://fokker.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www\\_slow.cgi](http://fokker.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www_slow.cgi)). La tabla 1 (artículo anexo) contiene las secuencias de los oligos diseñados. Se buscó que los oligos tuvieran una temperatura media de fusión ( $T_m$ ) similar, con una diferencia no mayor a un grado centígrado, que las últimas 5 bases no debían contener más de dos G ó C y que la  $T_m$  del amplicón fuera de 60° C con un tamaño entre 100 y 200 pb.

Las reacciones se llevaron a cabo en el equipo 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) utilizando el software 7500 System SDS software 1.2.1 (Applied Biosystems).

Para determinar la eficiencia de amplificación de cada par de oligonucleótidos, diluciones seriales de RNA, proveniente de células infectadas con la cepa RRV, se amplificaron mediante RT-PCR en tiempo real utilizando el par de oligos específico. Utilizando el software del equipo 7500 se estableció una línea de corte en el eje Y (fluorescencia), de tal forma que estuviera entre la fase logarítmica de las curvas de amplificación de las muestras analizadas. Posteriormente, se determinó el Ct para cada muestra. El Ct es el número de ciclo de amplificación en el cual la fluorescencia de dicha muestra alcanza el nivel establecido por la línea de corte. Después se realizó una curva estándar graficando los valores de Ct contra el logaritmo de la concentración de RNA de cada muestra y, mediante regresión lineal, se determinó la pendiente.

La eficiencia de amplificación de cada par de oligos fue entonces determinada usando la siguiente formula:

$$\text{Eficiencia} = (10^{(-1/\text{pendiente})} - 1) \times 100$$

Todos los pares de oligos escogidos tenían una eficiencia mayor al 90%.

Dado que el genoma de rotavirus es de RNA de doble cadena (dsRNA), el amplificar el RNA viral utilizando al mismo tiempo un par de oligos no nos permitiría distinguir las cantidades de RNA+ y RNA- (ya que tienen la misma secuencia sólo que complementaria). Por lo tanto, para cuantificar cada tipo de RNA viral de forma específica, el RNA se amplificó en dos pasos:

En el primer paso, se realizó una reacción de transcriptasa reversa utilizando el oligo complementario a la cadena que se deseaba cuantificar, usando la siguiente mezcla de reacción:

Cantidad	Reactivo
12.5µl	SYBR green Master Mix (Applied Biosystems)
0.125µl	transcriptasa reversa 50U/µl (Applied Biosystems)
0.25µl	Inhibidor de RNasas 40U/µl (Promega),
1µl	Oligo 2.5 pmol/µl
2µl	RNA (1 ng; resuspendido en agua, hervido por 5 minutos y enfriado en hielo)
24µl	Agua c.b.p.

La reacción se llevó a cabo a 48° C durante 30 minutos y, posterior a esto, las muestras se incubaron a 90° C por 10 min. y se enfriaron en hielo, esto con el fin de inactivar a la transcriptasa reversa.

El siguiente paso consistió en la amplificación del recién sintetizado cDNA, mediante PCR. Para ello, 1µl del oligo complementario (2.5 pmol/µl) se agregó a la mezcla de reacción para un volumen final de 25µl. La reacción de PCR se llevo a cabo en el equipo 7500 Real Time PCR System utilizando el siguiente protocolo: 95° C por 10 minutos y 40 ciclos de 95° C por 15 segundos y 60° C durante 1 minuto. Para observar si la amplificación fue específica, se agregó una etapa de disociación de 60° a 95° C durante 30 min. Finalmente, se determinó el Ct de cada muestra con el software 7500 system SDS detection.

El RNA puede ser cuantificado de dos formas: absoluta y relativa. La primera consiste en calcular la cantidad exacta (e.g. en nanogramos) del RNA blanco. La segunda consiste en determinar cuantas veces más hay de RNA blanco entre una muestra y otra. Es importante mencionar que en ambos tipos de cuantificaciones, la cantidad de RNA de polaridad negativa será expresada como dsRNA, ya que el RNA negativo únicamente se encuentra presente de esta forma. Mientras que la cantidad de mRNA viral es determinada al restarle a la cantidad de RNA viral de polaridad positiva calculada, la cantidad de RNA viral de polaridad negativa cuantificada para el mismo gen. Es decir, mRNA viral = RNA positivo – RNA negativo. Debido a que el RNA de polaridad positiva puede encontrarse tanto como mRNA como dsRNA.

A continuación se describirán las dos formas de cuantificar al RNA mediante RT-PCR en tiempo real:

### **Cuantificación absoluta**

La cantidad de RNA viral, ya sea de dsRNA o mRNA, se determinó al extrapolar el Ct obtenido de las muestras con cantidad de RNA viral desconocido contra una curva estándar generada a partir de muestras con una concentración conocida de dsRNA viral puro, la cual contiene cantidades equimolares de RNA viral positivo y negativo.

### **Cuantificación relativa**

El Ct obtenido al amplificar el RNA negativo o positivo se utilizó para calcular el incremento mediante el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Este método consiste en lo siguiente<sup>57</sup>:

1. El RNA de cada condición se amplifica con los oligos dirigidos contra el gen de interés y contra el gen que servirá como control endógeno [en este trabajo utilizamos GAPDH (gliceraldehido – 3 – fosfato deshidrogenasa)]
2. Calcular el Ct para la amplificación de cada muestra (problema y control endógeno)
3.  $\Delta Ct = Ct$  de la muestra  $a$  amplificada con los oligos para el gen  $x$  –  $Ct$  de la muestra  $a$  amplificada con los oligos para el gen control endógeno.
4. Después, se determina el valor del  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$  de la muestra  $a$  -  $\Delta Ct$  de la referencia, que es la muestra contra la que se desee determinar los incrementos (e.g. T0)
5. Los valores de incremento o decremento se calculan de la siguiente forma:  
Incremento =  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$

Debido a esto, el valor de la muestra de referencia llevará el valor de 1.

En este trabajo, la cantidad de RNA fue normalizada contra la cantidad de mRNA de GAPDH.

### ***Transfección de siRNAs***

Los siRNAs fueron obtenidos por Dharmacon Research (Lafayette, CO), las secuencias de los interferentes utilizados fue la siguiente:

<b>Nombre</b>	<b>Secuencia (5' – 3')</b>	<b>Ref</b>
Luciferasa	AAG UCG GUU GCU AGU ACC AAC	58
VP1	ACC AGU GAA UGU CGA UAA AGG	58
VP2	CUA GGC AAC UAC CAG UAU AGU	58
VP3	GAA GGU AUG UUG UGU UAA AGA	58
VP6	TGG AAC GAU AAU AGC CAG AAA	58
VP7	AAG UCG CUA CAG CUG AAA AAC	51
NSP3	AAU UGG AUG ACU GAC UCU CGA	42
NSP4	AAG GCC UCG GUU CCA ACC AUG	51

La transfección se llevo a cabo utilizando lipofectamina (Invitrogen, CA), mediante el siguiente protocolo: Para un pozo de caja de 24 pozos ( $2.5 \times 10^5$  células), se mezclaron  $3\mu\text{l}$  de siRNA con  $22\mu\text{l}$  de MEM y a esto se le agregó una mezcla de  $4\mu\text{l}$  de lipofectamina +  $21\mu\text{l}$  de MEM. Esto se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se agregaron  $150\mu\text{l}$  de MEM. Posteriormente, las células MA104 confluentes fueron lavadas dos veces con MEM y se les agregó la mezcla de transfección. Las células fueron incubadas por 8 horas a  $37^\circ\text{C}$ . Posteriormente, se retiró esta mezcla y las células se mantuvieron en MEM por 48 horas a  $37^\circ\text{C}$ .

### ***Determinación del número de partículas infecciosas***

Lisados celulares provenientes de células infectadas, fueron previamente incubados con  $10\mu\text{g/ml}$  durante 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$  para la activación de las partículas virales presentes. Posteriormente, células MA104 en cajas de 96 pozos se lavaron dos veces con PBS y se incubaron por 60 minutos a  $37^\circ\text{C}$  con diluciones seriales del lisado celular mencionado con anterioridad.

Después de este tiempo, el lisado fue retirado y las células se lavaron con MEM y se dejaron incubar por 14 horas a  $37^\circ\text{C}$ . Las células, se fijaron con  $50\mu\text{l}$  de acetona al 80% durante 30 min. y lavaron 2 veces con PBS. Posteriormente se incubaron con  $100\mu\text{l}$  de PBS con el anticuerpo policlonal anti YM (a una dilución 1:750) durante 1 hora a  $37^\circ\text{C}$ , después 4 lavados con PBS, las células se incubaron con proteína A – peroxidasa (dilución 1:3000 en PBS) durante 1 hora a  $37^\circ\text{C}$ . Finalmente se incubaron con  $50\mu\text{l}$  de sustrato (5 ml de buffer de acetatos + 1.5 ml de carbazol +  $10\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Como resultado de la reacción de la peroxidasa con el sustrato, las células infectadas adquieren

una tonalidad rojiza. El número de células infectadas se contaron con ayuda de Visiolab 1000 station (Bio-com, France) y el título viral se determinó de la siguiente manera:

Unidades formadoras de focos por mililitro = número de células infectadas x 9.5 x 20

Se utiliza el factor 9.5 debido a que el área de conteo de células infectadas, determinada por el software del equipo, es igual a un 10.5% del total del área del pozo, mientras que se utiliza el factor 20, debido a que el volumen utilizado para infectar son 50µl, lo cual equivale a 1/20 de un mililitro.

### **Western blot**

Las células fueron lisadas con Buffer Laemmli y las proteínas fueron separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida – SDS, ya sea al 7% ó al 10%, posteriormente fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa (Millipore, Bedford, MA).

Estas membranas fueron bloqueadas con 5% de leche descremada en PBS incubándolas durante una hora a temperatura ambiente con 5% de leche descremada en PBS. Después, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario indicado en PBS con 1% de leche descremada durante 1 hora a temperatura ambiente y con el anticuerpo secundario correspondiente (acoplados a peroxidasa o a los fluoróforos Alexa 488 ó 647) durante una hora a temperatura ambiente. La actividad de peroxidasa fue revelada mediante el Kit Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin Elmer Life Sciences), siguiendo las instrucciones del fabricante. La señal producida por los anticuerpos fluorescentes fue visualizada en un Typhoon Trio (Amersham), la intensidad de las bandas fue cuantificada utilizando el software ImageQuant TL.

### **Inmunofluorescencias**

Células MA104 fueron crecidas en cubreobjetos, transfectadas e infectadas como se describió anteriormente. A las 8 horas post-infección, las células se fijaron con 2% de paraformaldehído en PBS durante 20 min. a temperatura ambiente. Después de dos lavados con PBS con 50mM de NH<sub>4</sub>Cl se permeabilizaron con Tritón X-100 0.5% en PBS 50mM NH<sub>4</sub>Cl por 15 minutos y se lavaron 2 veces con PBS. Posteriormente las células fueron incubadas durante 1 hora con buffer de bloqueo (50mM NH<sub>4</sub>Cl, 1% suero de albúmina bovina (BSA) en PBS), 1 hora con el anticuerpo primario diluido en PBS, lavadas cuatro veces con PBS, incubadas durante 1 hora con el anticuerpo secundario

conjugado con el fluoróforo Alexa diluido en PBS y lavadas cuatro veces. Finalmente, las células fueron montadas en portaobjetos utilizando Fluoprep (Biomeérieux) y analizadas en un microscopio de epifluorescencia Nikon E600 acoplado a una cámara digital DXM1200. Las imágenes digitales fueron preparadas en Adobe Photoshop versión 7.0

### ***Marcaje radioactivo***

Células MA104 se crecieron en caja de 48 pozos, se transfectaron con los siRNAs y se infectaron con RRV como se describió con anterioridad. A las 7 horas post-infección, las proteínas sintetizadas de novo fueron marcadas radiactivamente durante 1 hora utilizando MEM sin metionina suplementado con 25  $\mu\text{Ci/ml}$  de Easy Tag EXPRESS- $^{35}\text{S}$  labeling mix (Dupont-NEN).

### ***Análisis de partículas virales***

Células MA104 se crecieron en cajas de 48 pozos, se transfectaron con los siRNAs indicados, las células se infectaron con RRV y a las 6 horas post-infección, las proteínas sintetizadas fueron marcadas radiactivamente como se describió anteriormente. A las 12 horas post-infección (hpi) las células se congelaron y descongelaron dos veces y las partículas virales fueron extraídas 2 veces con Freón 113 (Dupont, Wilmington, DE) y purificadas mediante centrifugación isopícnica en CsCl (2.2 gr. en 5 ml de volumen final, para obtener una densidad de  $1.36 \text{ g/cm}^3$ ) durante 18 horas a 35,000 rpm en un rotor SW40Ti.

Para el análisis del gradiente, se tomaron fracciones de 400 $\mu\text{l}$  (de abajo hacia arriba del tubo del gradiente) hasta coleccionar todo el gradiente (12 fracciones aproximadamente). Las proteínas de cada fracción se precipitaron con metanol mediante el siguiente método: 1 volumen de muestra + 3 volúmenes de metanol y agitación fuerte durante 10 segundos. Después se agregó 1 volumen de cloroformo, y se volvió a agitar durante 10 segundos. Las muestras se centrifugaron 5 minutos a 14000 rpm a temperatura ambiente. Finalmente, el sobrenadante fue eliminado y la pastilla obtenida se resuspendió en buffer Laemmli. Las proteínas fueron separadas mediante SDS-PAGE y visualizadas mediante autoradiografía. El análisis densitométrico de las bandas obtenidas se realizó utilizando el software ImageQuant TL.



## ***Clonación del gen 10 en pGEM-3Z***

Primero, el gen 10 de RRV se amplificó utilizando los siguientes oligos:

T7-10 Forward (5'-CGCGGCGCCTAATACGACTCACTATAGGCTTTTAAAAGTTCTG-3')

YM10 Reverse (5'-CAGACCCGGGCCGCGGTCACATTAAGACCGTTC-3')

El producto de PCR se cortó con las enzimas de restricción Kas I y Ava I (los sitios de corte de estas enzimas se encuentran subrayados en la secuencia de los oligos) y se ligó al plásmido pGEM-3Z (Promega) en los sitios de restricción Kas I y Ava I. Este plásmido lleva por nombre pGEM-3Z-NSP4 y tiene como característica principal que el 5' del gen 10 de rotavirus esta precedido por el promotor T7, mientras que contiene al promotor de SP6 después del extremo 3'.

## ***Síntesis de la sonda de RNA***

El plásmido pGEM-3Z-NSP4 se linearizó con EcoRI (que corta en el nucleótido 427 del gen clonado). Este DNA fue purificado con fenol-cloroformo y precipitado con etanol.

Posteriormente, se realizó una transcripción in vitro utilizando el Kit Megascript SP6 siguiendo las instrucciones del fabricante pero utilizando 1.66 mM de UTP y 0.66 mM DIG-UTP (Roche, Inc.) en la reacción. El RNA resultante (322 nucleótidos de largo), fue purificado mediante precipitación con LiCl y su concentración fue determinada por espectrometría. Esta sonda de RNA fue utilizada para los ensayos de FISH.

## ***FISH***

Se utilizó el protocolo de hibridación fluorescente in situ (fluorescence in situ hybridization, FISH) de Mingle et al<sup>59</sup>: Las células se crecieron, infectaron, fijaron y permeabilizaron como se describió en el apartado de inmunofluorescencia. Posterior al paso de permeabilización con Triton X-100, las células se incubaron con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 1.5% en PBS durante media hora a temperatura ambiente. Después, las células se incubaron toda la noche a 58° C con buffer de hibridación (50% formamida, 5x SSC (1x SSC es 0.15 M NaCl, 0.015 M citrato de sodio), 50 mg/ml heparina, 0.1% Tween 20 y 1µg /ml de RNA total de levadura) más la sonda de RNA (preparada como se describió) a una concentración de 0.2ng/µl en cámara húmeda.

Las células se lavaron tres veces con buffer de hibridación a 70° C durante 20 min. y tres veces con 0.1x SSC durante 10 min. a 70° C. Después, las células se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con buffer de bloqueo (1% BSA, 0.2% de leche, 0.3% Tritón X-100). La sonda hibridada fue detectada incubando las células con el anticuerpo monoclonal anti-DIG conjugado con peroxidasa (Roche, Inc.) durante 1 hora a una dilución de 1:1000 en buffer de bloqueo. La señal fluorescente fue amplificada utilizando el Kit Tyramide Signal Amplification system (TSA-Plus Fluorescence Palette System; Perkin Elmer) siguiendo las instrucciones del fabricante. El montaje de las células y visualización de la señal se realizó como se describió anteriormente para las inmunofluorescencias.

### ***Síntesis de los mRNAs reporteros***

- Para la producción del mRNA viral reportero, primero se utilizó el Kit QuikChange (Stratagene) para mutar el plásmido pGEM-3Z-NSP4 (descrito previamente) en las posiciones 190, y 193-196; este plásmido fue linearizado con el corte de SacII e incubado con T4 DNA polimerasa, en presencia de 100mM de nucleótidos, para producir extremos romos. Posteriormente, se realizó un ensayo de transcripción in vitro utilizando el kit MegaScript T7 transcription system (Ambion) en la presencia de un análogo de cap m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')G (New England Biolabs). Los mRNAs resultantes fueron purificados mediante extracción con fenol-cloroformo.
- El mRNA reportero de luciferasa fue sintetizado a partir del producto de PCR del plásmido luciferase T7 control plasmid (Promega) utilizando los oligos:

T7 Forward (5'-TAATACGACTCACTATAG-3')

Reverse (5'-AAAAAAAAAAAAAAAAACGTTATTGGCATCACCGGC-3')

El producto fue digerido con Acl I y purificado mediante fenol-cloroformo.

Finalmente, los mRNAs fueron sintetizados a partir de ambos DNAs mediante transcripción in vitro en presencia de un análogo de cap y purificados mediante fenol-cloroformo.

## ***Determinación de la vida media del mRNA reportero***

Los mRNAs reporteros (tanto virales como de luciferas) se transfectaron en células infectadas o no con rotavirus con el siguiente protocolo: 1µg de RNA transcrito in vitro fue transfectado durante 2 horas a 37° C en células MA10 crecidas en cajas de 12 pozos (5 x 10<sup>5</sup> células por pozo) infectadas con RRV (1 hora post-infección) o células no infectadas, utilizando Lipofectamine 2000 (Invitrogene). Después de las 2 horas, las células fueron lavadas 4 veces con MEM y fueron incubadas por 30 minutos a 37° C con 10mg/ml de Rnasa A en MEM. Al término de este periodo, se lavaron 4 veces con 1% BSA en MEM y 4 veces con MEM y fueron incubadas a 37° C durante diferentes tiempos. Finalmente, al término de la incubación, el RNA de estas células se extrajo utilizando TRIzol y se cuantificó mediante RT-PCR en tiempo real utilizando los oligos 10 mut, indicados en la tabla 1 (artículo anexo).

Los resultados de las cuantificaciones fueron graficadas y, mediante regresión lineal, se determinó el tiempo post-transfección en el cual la cantidad del mRNA reportero disminuía a un 50%.

## ***Inmunoprecipitación de complejos RNA-Proteína***

El protocolo utilizado está basado en el que reportaron Niranjankumari et al<sup>60</sup>: A menos que se indique lo contrario, los lavados, incubaciones y centrifugaciones se realizaron a temperatura ambiente. Células confluentes MA104 en cajas de 6 pozos (1.2 x 10<sup>6</sup> células) fueron infectadas con una multiplicidad de infección de 3. Las células se despegaron utilizando tripsina a las cinco hpi y se centrifugaron por 5 min. a 1200 RPM. Después, se lavaron una vez con 10 ml de MEM con suero y dos veces con 10 ml de PBS. Para el proceso de crosslinking, las células se resuspendieron en formaldehído al 1% en PBS (o únicamente en PBS, dependiendo de la proteína que se desee inmunoprecipitar) durante 10 minutos en agitación suave. La reacción de crosslinking se detuvo al agregarle 1 ml de una solución de Glicina 2.75 M en PBS e incubarla durante 5 min. a temperatura ambiente en agitación suave. Las células se lavaron 2 veces con PBS frío, centrifugando las células entre cada lavado a 2000 RPM durante 5 min. a temperatura ambiente. El sobrenadante fue retirado y la pastilla se guardó a -80° C.

Media hora antes de iniciar el método de inmunoprecipitación, la pastilla fue descongelada en hielo y resuspendida en 880µl de buffer RIPA (50 mM Tris-Cl, pH 7.5,

1% Tritón, 0.5% deoxicolato de sodio, 0.05% SDS, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl) más inhibidores de proteasas (complete, mini, EDTA-free protease inhibitor cocktail tablet, Roche Molecular Biochemicals, IN). Las células fueron lisadas mediante tres rondas de sonicación (amplitud: 7, output: 8-9 w) de 20 segundos cada una en un sonicador Branson Sonifier-250, con dos minutos de incubación en hielo entre cada ronda. Finalmente, el lisado celular se centrifugó durante 10 min. a 14000 RPM a 4° C. El sobrenadante fue separado y utilizado para la inmunoprecipitación.

### ***Inmunoprecipitación***

40µl de una suspensión al 50% de proteína A – sefarosa fueron incubados con 5µl de anticuerpo policlonal ó 2 µl de anticuerpo monoclonal y 80µl de buffer RIPA durante 2 horas a 4° C en agitación. Posteriormente, la proteína A – sefarosa se lavó 3 veces con RIPA y se incubó 10 min. con 1µl de RNAsin 40U/µl (promega) en 80µl de RIPA. Para inmunoprecipitar, 120µl de lisado celular fueron incubados con la proteína A – sefarosa durante 2 horas a temperatura ambiente. Al término de este tiempo, el sobrenadante proveniente de la inmunoprecipitación utilizando el anticuerpo irrelevante se recuperó y se liso con 400µl de TRIzol para extraer el RNA total no inmunoprecipitado. La proteína A – sefarosa de las muestras se lavó 4 veces con 500µl Buffer RIPA de alta astringencia (50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 1% Tritón, 1% deoxicolato de sodio, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 1 mM EDTA, 1 M NaCl, 1–4 M urea, 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride

(PMSF) ε ινιβιδορες δε προτεασας Χομπλετε (ροχηε) δυραυτε 6 μινυτοσ α τεμπερατυρα αμβιεντε εν αγιταχι ίν χονσταντε.

Παρα σεπαραρ ελ PNA δε λασ προτείνας ελ χροσσλινκινγ φυε ρεπερτιδο, εστο σε λογρ ί μεδιαντε λα ινχυβαχι ίν δε λα προτείνα A □ σεφαροσα χον 100µl de buffer [50 mM Tris-Cl, pH 7.0, 5 mM EDTA, 10 mM dithiothreitol (DTT) y 1% SDS] durante 45 min. a 70° C. Finalmente, el RNA contenido en el inmunoprecipitado se extrajo con 400µl TRIzol.

## Resultados

### ***Análisis de la cinética de transcripción y replicación del genoma de rotavirus***

Los resultados de esta parte del trabajo fueron publicados en el Journal of Virology bajo el título “Analysis of the Kinetics of Transcription and Replication of the Rotavirus Genome by RNA Interference” (Anexo I). A continuación se presenta un resumen con los resultados principales de este trabajo<sup>61</sup>:

Para estudiar la participación de las proteínas estructurales del virus en la transcripción y replicación virales, era necesario establecer primero un método de cuantificación del dsRNA (RNA genómico) y del mRNA viral. La técnica utilizada para la cuantificación debía ser específica, sensible y rápida de realizar. Es por ello que utilizamos RT-PCR en tiempo real para cuantificar a los RNAs virales a distintos tiempos post-infección.

Para poder cuantificar los RNAs virales, diseñamos tres pares de oligos específicos para los genes 1, 6 y 10 de rotavirus, los cuales representan los distintos tamaños del genoma (grande, mediano y pequeño, respectivamente). Además, utilizamos un par de oligos dirigidos contra el mRNA de gliceraldehido - 3 – fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como control interno. Las secuencias de estos oligos se encuentran en la tabla 1 (artículo anexo).

Para probar estos oligos, se infectaron monocapas de células MA104 con la cepa de rotavirus RRV y fueron cosechadas con TRIzol a las 0, 3, 6, 9 y 12 horas post-infección. Posteriormente, el RNA de cada condición fue purificado y se cuantificó tanto el dsRNA como el mRNA virales mediante RT-PCR en tiempo real utilizando los oligos mencionados.

Los resultados de estos ensayos muestran que la transcripción viral parece ser dependiente del tamaño, es decir, el mRNA del segmento más pequeño (gen 10) se acumula en mayor cantidad que el segmento más grande (gen 1) (figuras 1A y 1B - artículo anexo), mientras que, a pesar de las diferencias en tamaño y acumulación de los mRNAs virales, la acumulación de dsRNA de estos tres genes es aparentemente equimolar.

Para determinar si había una correlación entre la replicación del genoma y la formación de partículas infecciosas se compararon las cinéticas de síntesis de dsRNA y de focos infecciosos (Fig. 1C – artículo anexo). Los resultados muestran que ambas cinéticas siguen la misma tendencia: hay un pequeño incremento, tanto de dsRNA como de focos infecciosos, de 0 a 4 horas post-infección y un incremento logarítmico a tiempos posteriores.

Una vez conocida la cinética de transcripción y replicación virales, se estudió el papel de las proteínas virales que integran a la DLP en los procesos de transcripción y replicación. Para ello, las proteínas virales VP1, VP2, VP3 y VP6 fueron silenciadas específicamente mediante RNAi. Al silenciar la expresión de VP2 ó VP6 observamos una disminución general en la síntesis de proteínas virales, pero no cuando se silenciaron VP1 ó VP3 (Fig. 2 – artículo anexo).

Para comprobar que esta disminución en la traducción viral fuera debido al silenciamiento de VP2 ó VP6 y no a un efecto inespecífico de los siRNAs<sup>62</sup>, las células fueron transfectadas con los siRNAs dirigidos contra VP2 ó VP6 y posteriormente se infectaron utilizando las cepas de rotavirus YM y SA11 (que son de origen porcino y de simio, respectivamente). Las secuencias de los genes 2 y 6 virales de estas cepas difieren en 4 y 10 nucleótidos de las secuencias de los siRNAs que fueron diseñados específicamente contra la cepa RRV, por lo tanto, la expresión de las proteínas VP2 y VP6 de rotavirus YM y SA11 no debería verse afectada por estos interferentes. La Fig. 2D (artículo anexo), muestra que bajo estas condiciones de interferencia la traducción viral de estas cepas no se ve afectada por los siRNAs, descartando la posibilidad de que la disminución en la síntesis de proteínas de la cepa RRV fuese debido a un efecto inespecífico de los siRNAs dirigidos contra VP2 y VP6.

Posteriormente, se caracterizó el efecto de inhibir a las proteínas virales que forman a la DLP sobre la formación de partículas virales infecciosas. Para esto, células MA104, transfectadas con siRNAs dirigidos contra estas proteínas, fueron infectadas con RRV y a las 12 horas post-infección las células fueron lisadas. La cantidad de partículas infecciosas presentes en estos lisados fue determinada mediante ensayos de inmunoperoxidasa (Fig. 3 – artículo anexo). Los resultados muestran que hubo una severa disminución en la producción de partículas virales infecciosas cuando cualquiera de estas proteínas (VP1, VP2, VP3 y VP6) fue silenciada.

La replicación viral y el ensamble de los cores y las DLPs se llevan a cabo en estructuras electrodensas citoplasmáticas conocidas como viroplasmias, los cuales son agregados de proteínas y RNA virales. Para saber si las proteínas virales VP1, VP2, VP3 y VP6 eran necesarias para la formación de estas estructuras, se silenció la expresión de estas proteínas mediante RNAi y las células se infectaron. A las ocho horas post-infección se determinó la localización de la proteína viral NSP2 (proteína marcadora de viroplasmias) en estas células. Por inmunofluorescencia, encontramos que a pesar de haber disminuido eficientemente la expresión de VP1, VP2, VP3 y VP6, la formación de viroplasmias no se afectó significativamente, aunque dependiendo de la proteína viral silenciada el número y tamaño de los viroplasmias se veía modificado. (Fig. 4 – artículo anexo)

El siguiente paso fue investigar como se afectaban las cinéticas de transcripción y replicación virales durante la infección en ausencia de cualquiera de las proteínas virales que integran a las DLPs.

Encontramos que, al igual que para el ensamble de partículas infecciosas, VP1, VP2, VP3 y VP6 son necesarias para la transcripción y la replicación del genoma viral (Fig. 5 – artículo anexo). Estos resultados contrastan con aquellos obtenidos utilizando virus mutantes termosensibles, ya que en esos casos se observó que VP6 era importante para la transcripción viral pero no para la replicación. Por otra parte, en ensayos *in vitro*, se encontró que VP3 no es importante para la replicación, sin embargo, cuando se utilizaron mutantes termosensibles con una lesión en VP3 se observó que a temperaturas no permisivas, la formación de DLPs y TLPs disminuía y únicamente se formaban partículas virales ‘vacías’. A diferencia de esos ensayos, el uso de siRNAs disminuye considerablemente la expresión de la proteína blanco, por lo que quizá en ausencia de VP3 la formación de partículas virales si se ve afectada o, por el contrario, esta proteína viral sólo es necesaria para la replicación pero no para el ensamble de las partículas. Para establecer cual opción era la correcta, se purificaron y caracterizaron las partículas virales formadas en ausencia de VP3. Para ello, células MA104 fueron transfectadas con siRNAs dirigidos contra VP3 y posteriormente infectadas. Las proteínas sintetizadas de novo fueron marcadas radiactivamente y las células fueron cosechadas. Las partículas virales ensambladas en estas células fueron purificadas mediante centrifugación isopícnica en gradientes de cloruro de cesio; en este tipo de gradientes las partículas

virales son separadas de acuerdo a su densidad. Para caracterizar el tipo de partículas formadas, los gradientes fueron fraccionados y las proteínas virales presentes en cada fracción fueron separadas y visualizadas mediante PAGE y autoradiografía (Fig. 6A).

Observamos que cuando VP3 es silenciada mediante RNAi hubo una disminución en la formación de DLPs y TLPs (Fig. 6A, carriles 4 y 6 – artículo anexo), debido probablemente, a la disminución en la replicación viral observada. Sin embargo, no se observa una disminución significativa en la acumulación de partículas virales de baja densidad (Fig. 6A, carriles 10 y 11 – artículo anexo) en ausencia de VP3. La baja densidad de estas partículas, producidas tanto en células control como en donde se silenció la expresión de VP3, probablemente se debe a la poca cantidad de RNA viral asociado a ellas, ya que cuando se cuantificó el RNA<sup>-</sup> y RNA<sup>+</sup> presente en estas fracciones, se encontró que estas partículas tenían muy poco RNA viral asociado, el cual consistía mayoritariamente en RNA<sup>+</sup> (Fig. 6B – artículo anexo). Resultados muy similares fueron obtenidos cuando se caracterizaron las partículas virales formadas en ausencia de la proteína VP1.

Finalmente, el contenido proteico de las partículas de baja densidad producidas en ausencia de VP3 y VP1, fue caracterizado mediante PAGE y autoradiografía (Fig. 6C – artículo anexo). Interesantemente, encontramos que la ausencia de la proteína VP3 en estas partículas no evita que VP1 pueda incorporarse a estas partículas y viceversa, sugiriendo que el ensamble de este tipo de partículas es independiente de las proteínas VP1 y VP3.

Al comparar las cinéticas de transcripción viral en ausencia de VP1, VP2, VP3 ó VP6 (Fig. 5A – artículo anexo) con la cantidad de proteínas virales traducidas al interferir esas proteínas (Fig. 2A – artículo anexo), observamos que a pesar de que en los cuatro casos, la producción del mRNA viral se ve drásticamente disminuida, la síntesis de proteínas viral se ve afectada drásticamente únicamente al silenciar VP2 ó VP6.

Se ha propuesto que las proteínas VP1 y VP3 podrían interactuar con el mRNA viral como primer paso para la replicación del genoma viral; este intermediario de replicación posteriormente interactuaría con VP2 y las proteínas virales no estructurales NSP2 y NSP5, para formar a una partícula viral con actividad replicasa<sup>26</sup>. En base a este modelo de replicación viral, propusimos que al silenciar a las proteínas VP2 ó VP6, el poco mRNA viral sintetizado por la partícula viral que infectó a la célula pudiera estar



siendo ‘capturado’ por las proteínas VP1 y VP3 sintetizadas de novo; esta interacción evitaría que el mRNA viral estuviera disponible para la traducción y por lo tanto la síntesis de proteínas virales disminuiría significativamente. Por el contrario, al silenciar la expresión de VP1 ó VP3, este intermediario de replicación no se formaría, ya que faltaría una de las dos proteínas que interactúan inicialmente con el mRNA viral y, por lo tanto, el mRNA viral podría ser traducido.

Si VP1 está interfiriendo la traducción viral al formar el intermediario de replicación antes mencionado, entonces el co-silenciamiento de VP1-VP2 ó de VP1-VP6, traería como resultado un aumento de la traducción viral comparado contra los niveles de traducción viral donde sólo se silenció VP2 ó VP6. Para comprobar esta hipótesis, las células fueron transfectadas con combinaciones de RNAs de interferencia (VP1 – VP2 ó VP1 – VP6), después fueron infectadas y cosechadas para cuantificar los niveles de traducción viral bajo estas condiciones. Observamos que el co-silenciamiento de las proteínas VP1-VP2 no restauró la síntesis de proteínas virales ya que el nivel de traducción viral fue similar al obtenido cuando sólo la proteína VP2 fue silenciada. Al co-silenciar VP1 y VP6 se observó un aumento significativo en la traducción de proteínas virales con respecto a los niveles de traducción viral obtenidos al silenciar a VP6 (fig. 7A – artículo anexo). El hecho de que el co-silenciamiento de VP1-VP2 no produjera un recuperación de la traducción viral puede deberse a que la proteína VP2 tiene un papel importante en la estabilidad del mRNA viral, por lo que en su ausencia el mRNA viral podría ser degradado rápidamente.

Para comprobar esta posibilidad, medimos la vida media de un mRNA viral reportero (con la misma secuencia del mRNA del gen 10 de rotavirus) en células infectadas o no con rotavirus. Encontramos que en células infectadas no hay una degradación significativa del mRNA reportero hasta las 12 hpi, mientras que la vida media de este mRNA, medida en células no infectadas, fue de 12 horas. Este efecto es específico del mRNA viral reportero ya que la vida media de un mRNA de luciferasa no varió en ninguna condición (Fig. 8 – artículo anexo).

Una vez calculada la vida media del mRNA viral, se caracterizó si la estabilidad del RNA viral dependía particularmente de alguna de las proteínas virales que forman a la DLP. Para ello, VP1, VP2, VP3 y VP6 fueron silenciadas en células, las cuales fueron posteriormente infectadas por rotavirus, transfectadas con el mRNA reportero viral y

cosechadas a distintos tiempos post-infección. El mRNA reportero viral presente en las células a las distintas horas post-transfección fue cuantificado mediante RT-PCR en tiempo real.

Los diferentes resultados obtenidos al calcular la vida media del mRNA reportero viral, muestran que al silenciar la expresión de VP2, la vida media de este mRNA disminuyó a 9 horas. Por el contrario, al silenciar VP1, VP3, ó VP6, la vida media del mRNA reportero viral no cambió sugiriendo que estas proteínas no están involucradas en la estabilidad este mRNA (Fig. 9A – artículo anexo).

Para estudiar si la disminución en la vida media del mRNA viral en ausencia de VP2 se veía reflejada en la cantidad de mRNA viral presente en las células cuando esta proteína es silenciada, detectamos la presencia del mRNA viral producido en las células durante la infección por rotavirus, en ausencia de las proteínas VP1 ó VP2. Para ello, usamos la técnica de hibridación in situ fluorescente (FISH, por sus siglas en inglés), utilizando una sonda de RNA, producida in vitro en presencia de un nucleótido modificado (DIG-UTP), complementaria al extremo 3' del gen 10 de rotavirus (ver materiales y métodos).

Encontramos que, efectivamente, hubo una menor cantidad de mRNA viral presente en las células cuando la traducción de VP2 fue silenciada, confirmando los resultados obtenidos al cuantificar la vida media del mRNA viral en ausencia de esta proteína (Fig. 9B – artículo anexo).

### ***Efecto en la replicación y traducción virales de la unión de VP1 y NSP3 con el mRNA viral***

Los siguientes resultados forman parte de un segundo manuscrito que se encuentra en preparación. A continuación se muestra el resumen de los resultados obtenidos:

Al analizar las cinéticas de transcripción y replicación viral (Fig. 1 del artículo anexo) observamos que durante la infección viral se produce en promedio 7 veces más mRNA viral que dsRNA. A pesar de esto, no todo el mRNA es utilizado para la traducción viral ya que el mRNA producido por la partícula que infectó a la célula es suficiente para mantener la traducción viral a niveles normales ya que observamos que al

silenciar a VP1, la transcripción y la replicación virales se ven drásticamente afectadas pero la traducción viral no cambia.

Más de la mitad de las proteínas de rotavirus tienen actividad de unión al RNA, ya sea mediante interacciones dependientes de secuencia o no<sup>63</sup>. Dado que no se sabe a qué está unido la mayoría del mRNA viral producido durante la infección, decidimos investigar la proporción del RNA viral transcrito unido a las proteínas virales VP1, VP2, NSP2, NSP3 y NSP5.

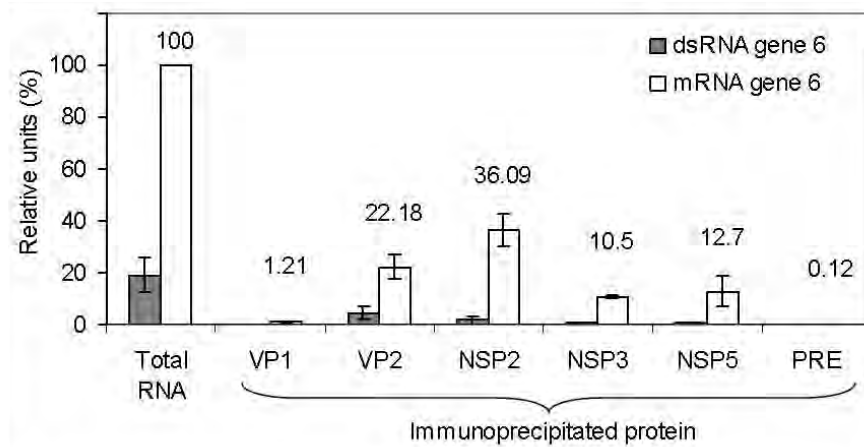
Para cuantificar el RNA viral asociado a estas proteínas utilizamos el método reportado por Niranjanakumari et al<sup>60</sup>, el cual consiste en inmunoprecipitar los complejos RNA-proteína formados en células en cultivo, las cuales previamente han sufrido un crosslinking reversible. El RNA asociado a estos complejos es liberado de las proteínas asociadas y cuantificado mediante RT-PCR en tiempo real utilizando oligonucleótidos específicos.

Uno de los pasos importantes en la inmunoprecipitación de los complejos RNA-proteína es la determinación de la concentración óptima de formaldehído para realizar el entrecruzamiento entre el RNA y las diferentes proteínas que se deseen analizar<sup>60</sup>. Para determinar la concentración de formaldehído adecuada para cada proteína utilizada en este ensayo, células infectadas con rotavirus fueron incubadas con diferentes concentraciones de formaldehído (desde 0% hasta 1%). Posteriormente se inmunoprecipitó la proteína deseada y se cuantificó el RNA viral asociado a cada una de estas proteínas. La concentración óptima fue aquella concentración de formaldehído que daba como resultado una mayor cantidad de mRNA viral asociado a cada proteína. En nuestro caso, encontramos que la concentración óptima para inmunoprecipitar las proteínas analizadas fue de 1% excepto para la proteína NSP3 que en este caso la mayor cantidad de RNA viral asociado se obtuvo en ausencia de formaldehído (datos no mostrados).

Ya establecidas las condiciones de crosslinking, el siguiente paso fue cuantificar el porcentaje de mRNA viral asociado a las proteínas virales VP1, VP2, NSP2, NSP3 y NSP5 (que han sido reportadas con actividad de unión a RNA). Para ello, células se infectaron con rotavirus y a las 5 hpi se llevó a cabo el proceso de crosslinking para entrecruzar los complejos RNA-proteína formados durante la infección. Después, las proteínas fueron inmunoprecipitadas utilizando los anticuerpos específicos respectivos y

finalmente, el mRNA y dsRNA virales presentes en los inmunoprecipitados fue cuantificado mediante RT-PCR en tiempo real (Fig. 10).

Los resultados obtenidos muestran que del total de mRNA viral presente a las 5 hpi, aproximadamente un 90% se encontró asociado a las proteínas virales inmunoprecipitadas (Fig. 10).

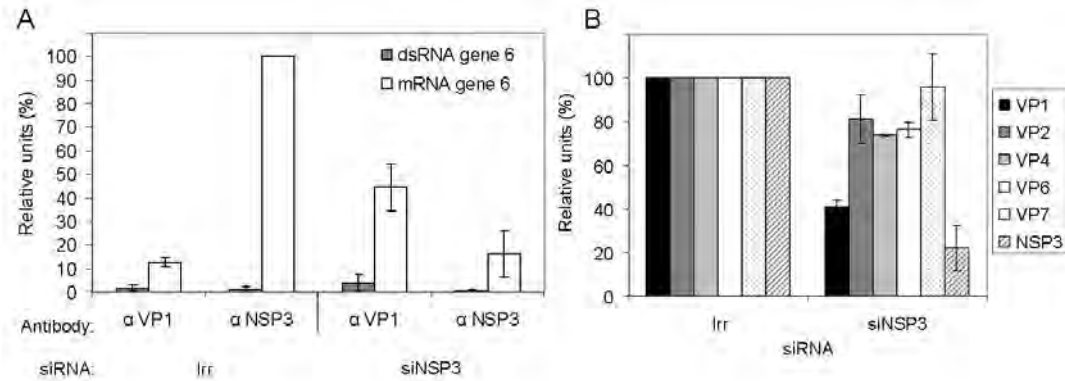


**Figura 1.** Células MA104 fueron infectadas con rotavirus a una multiplicidad de infección de 3. A las 5 hpi se realizó el proceso de crosslinking con formaldehído. Posteriormente, las células fueron lisadas y las proteínas fueron inmunoprecipitadas utilizando anticuerpos específicos o un anticuerpo irrelevante (PRE). El RNA asociado a estas proteínas fue extraído mediante trizol y cuantificado mediante RT-PCR en tiempo real utilizando oligos específicos. Los valores están referidos como porcentaje con respecto a la cantidad de mRNA viral total presente en las células (Total RNA, 100%) y se presenta el promedio de tres experimentos independientes con desviación estándar.

De las proteínas virales inmunoprecipitadas, NSP3 y VP1 tienen afinidad al RNA viral de manera secuencial específica. Se ha propuesto que VP1, al unirse a los mRNAs virales podría seleccionar a aquellos que serían utilizados como plantillas para la replicación viral. Para estudiar esta posibilidad determinamos si la cantidad de mRNA unido a VP1 se veía modificada cuando la replicación era modificada como resultado del silenciamiento de algunas proteínas virales.

En el 2002, Montero et al<sup>42</sup> reportaron que al silenciar a la proteína viral NSP3 la traducción de proteínas virales no parecía verse afectada, sin embargo, la transcripción y replicación virales aumentaban tres veces. Para comprobar si este aumento en la replicación viral se veía reflejado en un aumento en la cantidad de RNA viral asociado a VP1, cuantificamos la cantidad de RNA viral que se une a VP1 al silenciar a NSP3. Para ello, las células fueron transfectadas con un siRNAs dirigido contra NSP3 y

posteriormente las células fueron infectadas, y las proteínas virales VP1 y NSP3 de este ensayo fueron inmunoprecipitadas. El mRNA viral unido a ambas proteínas fue cuantificado mediante RT-PCR en tiempo real (Fig. 11).



**Figura 2.** Células MA104 fueron transfectadas con siRNAs dirigidos contra NSP3 (siNSP3) o contra una proteína no presente en las células (lrr). **A.** A las 5 horas post-infección las células fueron sometidas al tratamiento de crosslinking, posteriormente las proteínas indicadas fueron inmunoprecipitadas y el RNA viral fue cuantificado mediante RT-PCR en tiempo real. Los valores están referidos a la cantidad de mRNA viral unido a NSP3 en las células transfectadas con el siRNA irrelevante (100%) **B.** A las 8 horas post-infección las células fueron lisadas con buffer Laemmli y las proteínas virales presentes en estos lisados fueron fraccionadas y visualizadas mediante PAGE y Western blot utilizando anticuerpos específicos. Se muestra la densitometría de las bandas resultantes específicas para cada proteína viral, la densitometría fue realizada mediante el software ImageQuant TL. En ambas gráficas se presenta el promedio de tres experimentos independientes y la desviación estándar.

Como era de esperarse, al silenciar la expresión de la proteína NSP3 encontramos una menor cantidad de mRNA viral asociado a esta proteína con respecto a la cantidad de mRNA viral cuantificado en las células donde se utilizó el interferente irrelevante, por lo que estos resultados reflejan el nivel de eficacia de la inhibición de la traducción de NSP3. Interesantemente, la disminución en el mRNA viral unido a NSP3 no afectó significativamente la síntesis de proteínas virales (fig. 11B).

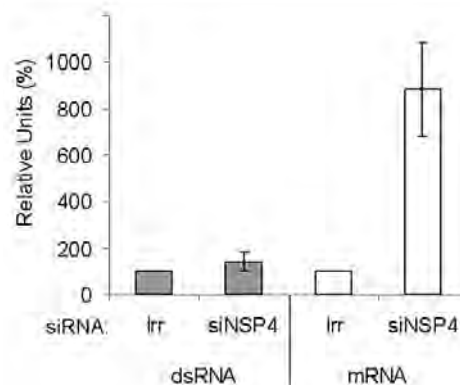
Al cuantificar el mRNA viral asociado a la proteína VP1 observamos que se unía tres veces más el mRNA viral a esta proteína en las células donde se silenció NSP3; es interesante notar que este aumento correlacionó con el aumento en la replicación viral observado al silenciar a NSP3<sup>42</sup>.

Ya que un aumento en la replicación viral tiene como consecuencia un aumento en la transcripción viral debido a que las DLPs producidas son capaces de sintetizar varias rondas de mRNA, era posible que el aumento en la cantidad de mRNA viral unido a VP1 cuando silenciamos NSP3 fuera debido a una mayor cantidad de mRNA

disponible para interactuar con VP1. Por lo tanto, el aumento en la cantidad de RNA unido a VP1 posiblemente no fuera la causa del aumento en la replicación.

Para diferenciar entre estas dos posibilidades, cuantificamos el mRNA viral unido a VP1 en una condición en la cual la transcripción viral, pero no la replicación, aumentara considerablemente.

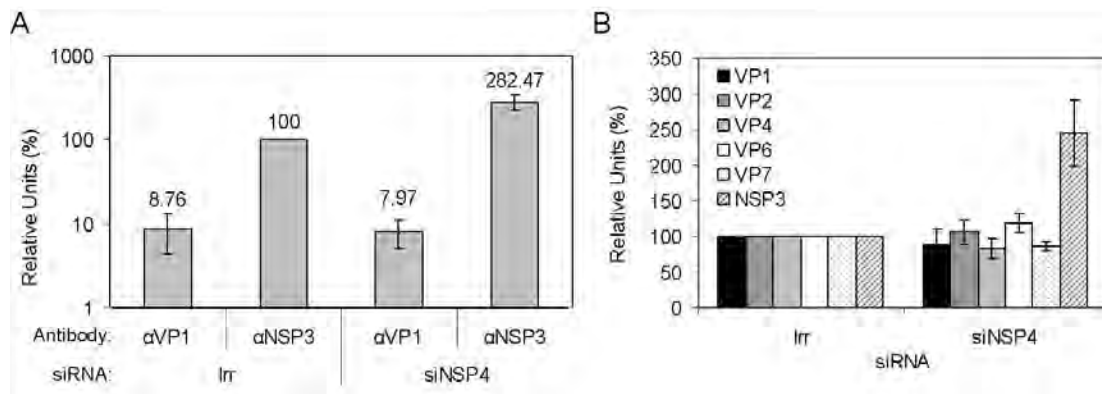
A pesar de que la proteína viral NSP4 no participa directamente con el proceso de replicación viral, se ha observado que al silenciar a esta proteína, las DLPs no pueden migrar hacia el retículo endoplásmico; esto provoca una acumulación de estas partículas en el citoplasma. Esto conlleva a un incremento en la acumulación de transcritos virales; Interestingly, a pesar del aumento en la cantidad de mRNA viral, la replicación viral no se ve afectada (Ref.<sup>45</sup> y Fig. 12).



**Figura 3.** Células MA104 fueron transfectadas con un siRNA dirigido contra NSP4 (siNSP4) y contra una proteína irrelevante (Irr). Posteriormente, fueron infectadas con una multiplicidad de infección de 3. A las 0 y 5 hpi, las células fueron lisadas con TRIzol. El RNA total fue purificado y cuantificado mediante RT-PCR en tiempo real. Los valores están referidos con respecto a la cantidad de dsRNA o mRNA del gen 6 de rotavirus en las células transfectadas con el siRNA Irr (100%).

Como podemos observar en la figura 12, cuando NSP4 es silenciada hay un aumento en la acumulación de mRNA viral pero no en la replicación del genoma de rotavirus. Bajo estas condiciones decidimos investigar si el aumento del mRNA viral unido a VP1 observado al silenciar NSP3 era debido al aumento en la producción de mRNA viral o era la causa del aumento en la replicación.

Para investigar esto, las células fueron transfectadas con el siRNAs dirigido contra NSP4. Posteriormente, las células fueron infectadas y el mRNA unido a VP1 y NSP3 fue cuantificado mediante RT-PCR en tiempo real; además, en paralelo la síntesis de proteínas virales se cuantificó (Fig. 13).



**Figura 4.** Células MA104 fueron transfectadas con los siRNAs indicados e infectadas con RRV como previamente se describió. **A** Las células fueron sometidas al tratamiento de crosslinking a las 5 hpi. Las proteínas virales indicadas fueron inmunoprecipitadas y el RNA unido a estas fue cuantificado utilizando RT-PCR en tiempo real. Los valores están referidos a la cantidad de mRNA viral (gen 6) unido a NSP3 en las células transfectadas con el siRNA irrelevante (100%). **B** A las 8 horas post-infección las células fueron lisadas y fraccionadas mediante PAGE, transferidas a membranas de nitrocelulosa y detectadas mediante WB utilizando anticuerpos específicos. Se muestra la densitometría de las bandas resultantes, ésta fue realizada mediante el software ImageQuant TL. Los valores están referidos con respecto a la cantidad detectada de cada una de las proteínas en las células transfectadas con el siRNA irrelevante (100%). En ambos casos se muestra el promedio de tres experimentos independientes y la desviación estándar

La figura 13 muestra que a pesar del incremento en la producción de mRNA viral, no se observa un cambio significativo en la cantidad de mRNA viral unido a VP1 cuando la proteína NSP4 es silenciada, indicando que la interacción entre VP1 y el mRNA viral no depende de la cantidad de mRNA viral presente en las células (Fig. 13 A). Estos resultados en conjunto sugieren una correlación entre la unión del mRNA viral a VP1 y los niveles de replicación viral.

Por el contrario los resultados muestran un aumento importante en la cantidad de mRNA unido a la proteína NSP3 cuando NSP4 es silenciada (Fig. 13 A). Este aumento podría deberse al aumento en la traducción de NSP3 (Fig. 13 B) y/o al aumento existente en la transcripción viral (Fig. 12), ya que esto significa una mayor cantidad de mRNA disponible para interactuar con la proteína NSP3. Interesantemente, a pesar de los incrementos observados en la traducción de NSP3, en el mRNA viral producido y en el mRNA viral unido a NSP3, la traducción viral no se ve incrementada significativamente.

En estudios anteriores se ha encontrado que al silenciar un gen viral cuya proteína no participa en la replicación viral (por ejemplo VP4 ó VP7), hay una disminución del mRNA de este gen, pero no en la replicación de dicho gen. Es decir, la replicación de los

11 segmentos virales se lleva a cabo a niveles equimolares a pesar de que los niveles de mRNA del gen silenciado se vean reducidos. Para explicar estos resultados se ha propuesto que el mRNA viral que es utilizado para la replicación viral no es transportado desde el citoplasma hacia los viroplasmos, sino que el mismo mRNA producido dentro del viroplasma por las DLPs es utilizado por las partículas virales que se están ensamblando como templado para la replicación. Debido a esta localización subcelular, el mRNA viral que es utilizado para la replicación no podría ser blanco de la degradación por el sistema de procesamiento de los siRNA (RISC)<sup>55,64</sup>.

Para determinar si el mRNA unido a VP1 se encuentra protegido de la degradación por RISC, cuantificamos el mRNA de dos genes virales asociados a VP1 al silenciar a VP7. Como se mencionó anteriormente, esta proteína no participa en el proceso de transcripción y replicación virales y, por lo tanto, su ausencia no afecta la cantidad de mRNA y dsRNA virales producida<sup>64</sup>.

Como paso inicial, comprobamos que al silenciar VP7, sólo se afectaría el mRNA del gen de VP7, mientras que la cantidad de dsRNA de este gen no se viera afectada. Para esto, las células se transfectaron con el siRNA específico contra VP7, posteriormente, las células se infectaron con RRV y se cosecharon a las cinco hpi. Mediante RT-PCR en tiempo real, cuantificamos la cantidad de mRNA y dsRNA virales de dos genes virales: el gen 9, el cual codifica para VP7 y contra el cual van dirigidos los siRNAs; y el gen 10 (como gen irrelevante), a partir del cual se traduce la proteína viral NSP4. Escogimos al gen 10 debido a que, al igual que VP7, la proteína NSP4 se traduce en el retículo endoplásmico. Los resultados de esta cuantificación se muestran en la figura 14.

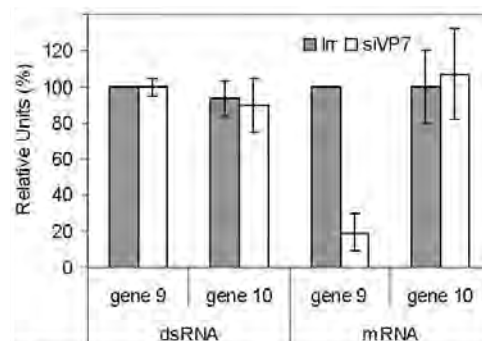


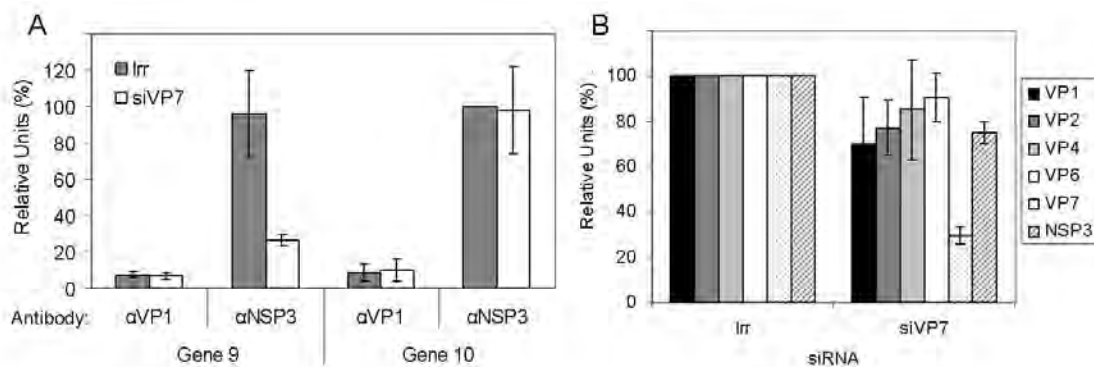
Figura 5. Células MA104 fueron transfectadas con el siRNA indicado e infectadas con una multiplicidad de infección de 3. A las 5 horas post-infección las células fueron lisadas con TRIzol para la purificación del RNA total. El mRNA y dsRNA fueron cuantificados mediante RT-PCR tiempo real utilizando oligos específicos para el gen 9 (VP7) y gen 10 (NSP4) de RRV. Los valores



están referidos al 100% que corresponde a la cantidad de dsRNA o mRNA del gen 9 presente en las células transfectadas con el siRNA irrelevante.

Encontramos que solamente en las células donde se transfectaron los siRNAs dirigidos contra VP7, el mRNA del gen 9 (que codifica para VP7) disminuyó significativamente; la cantidad de dsRNA de este gen y la del gen 10 (tanto dsRNA como mRNA) no se afectaron en estas condiciones.

Una vez que se comprobó que la RNAi afecta la cantidad de mRNA viral, pero no la de dsRNA del segmento contra el cual va dirigida, analizamos si la cantidad de mRNA viral unido a VP1 tanto del gen 9 como del gen 10 se veía afectada cuando VP7 era silenciada. Para ello, las células se transfectaron con el siRNA dirigido contra VP7, y después estas células fueron infectadas durante 5 horas. Finalmente, VP1 y NSP3 fueron inmunoprecipitadas y se cuantificó el mRNA viral de los genes 9 y 10 unido a estas proteínas. De forma paralela, se cuantificó la síntesis de proteínas virales (Fig. 15).



**Figura 6.** Células MA104 fueron transfectadas con el siRNA indicado y posteriormente infectadas con RRV a una multiplicidad de infección de 3. **A.** 5 horas post-infección, las células fueron sometidas al tratamiento de crosslinking y las proteínas indicadas fueron inmunoprecipitadas de estos lisados con los anticuerpos indicados. El RNA fue purificado con TRIzol y cuantificado mediante RT-PCR en tiempo real utilizando oligos específicos. Los valores están referidos a la cantidad de mRNA del gen 10 unido a NSP3 en células transfectadas con el siRNA Irrelevante (100%). **B.** 8 horas post-infección, las células fueron lisadas utilizando buffer Laemmli. Las proteínas fueron fraccionadas y visualizadas PAGE y western blot. El análisis densitométrico de las bandas resultantes se llevo a cabo utilizando el software ImageQuant TL.

La figura 15 muestra que el mRNA del gen 9 (VP7) asociado a NSP3 si puede degradarse cuando las células son transfectadas con los siRNAs dirigidos contra VP7, mientras que el mRNA de un gen viral irrelevante (gen 10) asociado a NSP3 no es afectado, esto es debido a la especificidad del sistema de degradación mediada por siRNAs.

Por otra parte, la cantidad de mRNA tanto del gen 10 (irrelevante) como del gen 9 (gen contra el cual van dirigidos los siRNAs específicos para VP7) unido a VP1 no disminuyó en las células que fueron transfectadas con los siRNAs dirigidos contra VP7 (Fig. 15). Estos resultados en conjunto, indican que el complejo mRNA viral – VP1 no esta accesible a la maquinaria de degradación RISC (debido a que posiblemente este complejo viral se forme en el interior de los viroplasmos) o que VP1 pudiera proteger a los mRNAs virales contra la degradación.

Finalmente, cuando VP7 es silenciada, el nivel de las demás proteínas virales no disminuye significativamente, este resultado concuerda con el hecho de que al silenciar a VP7, únicamente se ve afectada la cantidad de mRNA del gen 9 (el cual está siendo silenciado) unido a NSP3. Este resultado se debe a que el mRNA unido a NSP3 se encuentra localizado en un sitio accesible al complejo de degradación por RISC y/o a que NSP3 no ofrece protección contra esta degradación.

## Discusión

Como paso inicial en el estudio de la participación de las proteínas de rotavirus en la replicación y traducción del mRNA viral, se cuantificó la producción de mRNA y dsRNA virales a lo largo de la infección. Para ello se utilizó un método rápido de cuantificación de ácidos nucleicos que evitara el uso de compuestos radioactivos y que además, nos permitiera cuantificar de manera sensible e independiente al dsRNA y al mRNA virales. El método elegido fue PCR en tiempo real, por las múltiples ventajas que presenta<sup>65</sup>.

La cuantificación de mRNA y dsRNA de tres distintos genes virales mostró que la transcripción viral parece ser dependiente del tamaño, es decir, entre más grande sea el gen viral, la acumulación de su mRNA será menor. Las diferencias encontradas en la transcripción viral no se vieron reflejadas en la síntesis de dsRNA viral ya que la replicación de los tres genes virales analizados resultó equimolar.

Estos resultados no concuerdan con los obtenidos en trabajos anteriores en los que se cuantificó la producción de mRNA y dsRNA en otras cepas virales. Los resultados de la cuantificación del mRNA del virus bovino UK<sup>66</sup> mostraron que los niveles de transcripción viral no van de acuerdo al tamaño del segmento de RNA viral analizado. Por otra parte la replicación del genoma de UK no fue equimolar, mientras que en este trabajo encontramos que los niveles de replicación de los genes de RRV son muy similares entre sí. A diferencia de los resultados obtenidos para la cepa UK, las cinéticas de transcripción y replicación de la cepa viral SA11 (de simio) concuerdan con los obtenidos en este trabajo para la cepa RRV, ya que se encontró que la transcripción viral parece depender del tamaño del segmento es decir, se acumula una mayor cantidad de mRNA del gen 10 que del gen 1 de rotavirus; por otra parte, la replicación fue equimolar para todos los segmentos de RNA del genoma de la cepa SA11<sup>67</sup>.

Posiblemente la discrepancia en los resultados obtenidos al cuantificar los diferentes tipos de RNA producidos por la cepa UK con respecto a las cepas RRV y SA11 se deba al método utilizado para la cuantificación de los ácidos nucleicos virales, ya que los niveles de acumulación de los RNAs de la cepa UK producidos durante la infección fueron obtenidos mediante el uso de sondas radioactivas complementarias al RNA viral blanco<sup>68</sup>, por lo que es posible que estas sondas radioactivas tuvieran una

eficiencia distinta para cada uno de los distintos tipos de RNA virales. Por otra parte, la cuantificación de los distintos genes virales mediante geles de agarosa para la cepa SA11, permitió la visualización directa de los mRNAs, mientras que el uso de RT-PCR en tiempo real, para cuantificar el RNA de la cepa RRV, se llevó a cabo utilizando oligonucleótidos con una eficiencia de cuantificación cercana al 100% (datos no mostrados). Sin embargo, también es posible que los resultados obtenidos para la cepa UK no sean debido a artefactos en el método utilizado, sino que, estas diferencias sean reales y muestren una regulación en la replicación y transcripción virales distintas a lo reportado para otras cepas de rotavirus.

Un análisis más a fondo de las cinéticas de acumulación de dsRNA y mRNA de los tres distintos genes virales analizados para la cepa RRV, mostró un comportamiento muy similar: una acumulación lineal de dsRNA y mRNA virales hasta las 4 horas post-infección, seguido de un incremento exponencial desde las 4 hasta las 12 hpi, este aumento en la producción de mRNA viral es conocido como segundo ciclo de transcripción<sup>5</sup>. Este segundo ciclo no se observó cuando se inhibió la expresión de cualquiera de las proteínas que integran a la DLP (VP1, VP2, VP3 y VP6). Estos resultados demuestran directamente, que el segundo ciclo de transcripción viral se debe a la síntesis de mRNA viral a partir de las DLPs producidas de novo en la célula infectada.

Al caracterizar los fenotipos observados al inhibir específicamente la traducción de las proteínas virales que forman a la DLP, encontramos que algunos de los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con los que se habían encontrado al utilizar ensayos de replicación *in vitro* o con virus mutantes termosensibles. Por ejemplo, mediante ensayos de replicación *in vitro*, se encontró que VP1 y VP2 eran necesarias para la replicación de un RNA exógeno con las secuencias 5' y 3' de rotavirus<sup>52</sup>. Por otra parte, al estudiar la transcripción y replicación virales utilizando un virus mutante termosensible con una lesión monogénica en VP3, se observó una inhibición en la replicación viral cuando las células fueron infectadas a temperaturas no permisivas, indicando que, *in vivo*, no sólo VP1 y VP2 eran necesarias para la replicación viral sino que además VP3 estaría participando en este proceso<sup>53</sup>. De forma similar, en este trabajo encontramos que en ausencia de VP1, VP2 y VP3 la transcripción y replicación virales fueron drásticamente afectadas.

Una caracterización más a fondo del fenotipo obtenido al silenciar VP3 y VP1 mostró que en ausencia de estas proteínas hay una reducción significativa en la formación de DLPs y TLPs. Sin embargo, la formación de partículas virales de baja densidad no se vio afectada, indicando que estas proteínas virales no participan en el proceso de morfogénesis viral. Sin embargo, es interesante notar que se detectó la presencia de RNA de polaridad positivo y de proteínas virales no estructurales en la misma fracción de los gradientes de cloruro de cesio utilizados para separar a las partículas virales de acuerdo a su densidad. Esto nos llevó a pensar que posiblemente, estas partículas de baja densidad podrían tratarse de intermediarios de replicación, los cuales, a pesar de estar asociados al core viral no han podido completar el proceso de síntesis de dsRNA. Asimismo, Vásquez et al reportaron que las partículas de baja densidad, formadas durante la infección con un virus mutante con una lesión en VP3, eran inestables sugiriendo que la estabilidad de las partículas virales podría depender de la presencia de dsRNA en su interior<sup>53</sup>.

Por otra parte un resultado inesperado fue la drástica disminución en la replicación viral en células donde se silenció la traducción de VP6, debido a que tanto al utilizar ensayos in vitro como al utilizar virus termosensibles con una lesión en VP6 se había reportado que esta proteína viral era importante en el proceso de transcripción viral pero no en el proceso de replicación del genoma de rotavirus<sup>23, 35</sup>.

Es posible que esta disminución en la replicación viral sea debido a que en ausencia de VP6, la traducción de proteínas virales se disminuye drásticamente incluyendo la traducción de proteínas virales importantes en la replicación, como son VP1, VP2, VP3, NSP2 y NSP5. En otras palabras, la disminución en la replicación viral, podría no deberse a la participación directa de VP6 durante el proceso de replicación viral, sino que esta disminución podría ser consecuencia de un descenso general en la traducción de proteínas virales.

El hecho de que la replicación viral se vea afectada significativamente al silenciar la expresión de VP6 mediante la RNAi, pero no al utilizar un virus mutante termosensible podría deberse a que con el uso de la RNAi se está inhibiendo completamente la expresión de la proteína, mientras que al usar mutantes termosensibles, otras funciones de VP6 podrían no afectarse a las temperaturas no permisivas<sup>35</sup>.

Por otro lado, encontramos que durante una infección en células transfectadas con una combinación de siRNAs dirigidos contra las proteínas VP6 y VP1, los niveles de traducción de todas las proteínas virales fueron significativamente mayores a la cantidad de proteína viral sintetizada en células donde se silenció únicamente a la proteína de VP6. Estos resultados sugieren que VP1 podría estar afectando negativamente la traducción de los RNAs virales.

Uno de los mecanismos por el cual VP1 podría inhibir la traducción viral es mediante su interacción de forma específica con el extremo 3' de los RNAs virales para formar los intermediarios de replicación<sup>26</sup>. La formación de estos intermediarios de replicación pudiera prevenir la asociación de los factores de traducción celular al mRNA viral y, por lo tanto, evitaría que éste pudiera ser utilizado para la traducción. Un mecanismo similar al propuesto, se ha observado en algunos virus de polaridad positiva, como poliovirus, en donde la unión del factor celular PCBP con el extremo 5' del RNA viral, favorece la traducción, mientras que la unión de la proteína viral 3CD inhibe la traducción y favorece la replicación viral<sup>69</sup>.

Este mecanismo propuesto de modulación de la función del mRNA viral, ya sea como molde para la replicación o para la traducción, puede ser funcional durante las primeras horas post-infección, antes de que la producción de mRNA viral sobrepase al número de moléculas de VP1 producidas. Sin embargo, este modelo no descarta la posibilidad de que otros factores, ya sea proteínas celulares o virales, pudieran tener también alguna participación en la regulación de la traducción de los mRNAs virales.

Otro elemento que parece estar regulando la traducción viral es la proteína estructural VP2. En efecto, cuando VP2 fue silenciada observamos una disminución en la síntesis de proteínas virales; en este caso, el co-silenciamiento de VP1 y VP2 no restauró los niveles de proteína viral sintetizada, sugiriendo que la disminución en la traducción viral no se debe exclusivamente a la presencia de VP1.

Los resultados obtenidos indican que VP2 es importante para la estabilidad del mRNA viral, ya que en ausencia de esta proteína, la vida media de un mRNA reportero (con la misma secuencia que el mRNA del gen 10 de rotavirus) disminuyó significativamente. Al observar (mediante FISH) al mRNA viral presente durante la infección, se encontró una disminución considerable en la cantidad de mRNA viral en las células donde se silenció la expresión de VP2 comparado con las células donde se

interfirió la traducción de la proteína VP1, a pesar de que en ambos casos la replicación viral disminuyó drásticamente.

Las diferencias observadas podrían no deberse únicamente a una disminución en la vida media del mRNA viral, ya que al silenciar a VP2, la vida media del mRNA viral fue de 9 horas, la cual no es lo suficientemente corta como para producir la disminución observada en la cantidad de mRNA viral presente en las células. Sin embargo, también es posible que la transcripción de las partículas virales que infectaron a la célula se vea afectada cuando se silencia la expresión de VP2, lo cual traería como consecuencia la drástica disminución en la cantidad de mRNA viral observada en las células donde VP2 fue silenciada (Fig. 9B – artículo anexo)

Los niveles de traducción viral obtenidos al silenciar a las proteínas virales que integran a la DLP, no concuerdan con los resultados obtenidos por Silvestri et al<sup>45</sup> al cuantificar la proteína viral producida en ausencia de VP1 ó VP2, ya que ellos encontraron que bajo estas condiciones de interferencia hay una reducción en la traducción viral de únicamente un 50%. En nuestras manos, al silenciar VP2 la traducción viral disminuyó a un 20% mientras que al silenciar VP1 la traducción aumentó en un 30% aproximadamente. Posiblemente las diferencias encontradas en ambos reportes podrían deberse a las características propias de cada cepa de rotavirus ya que en este trabajo se utilizó la cepa viral RRV mientras que Silvestri et al utilizaron SA11.

Al analizar las cinéticas de acumulación de mRNA y dsRNA virales, se encontró que: 1) no todo el mRNA viral está siendo utilizado para la replicación y 2) el mRNA producido por la partícula que infectó a la célula es suficiente para que la traducción viral se mantenga a niveles de una infección normal. Por lo tanto, la siguiente pregunta que se intentó responder fue ¿a qué proteínas está asociado el mRNA viral?

Debido a que la función del mRNA puede depender de las proteínas a las que se encuentre asociado, decidimos inmunoprecipitar los complejos RNA – proteínas virales formados durante la infección por rotavirus y cuantificar la cantidad de RNA unido a cada proteína. Encontramos que casi el 80% del mRNA viral está interactuando con alguna (o algunas) de las proteínas virales involucradas en la replicación viral. El hecho de que la mayoría del RNA viral se encuentre asociado a proteínas que participan en la replicación viral y en la formación de viroplasmos (NSP2 y NSP5), concuerda con

reportes previos donde se había encontrado que la mayoría del mRNA viral es producido y se encuentra contenido en los viroplasmos; sin embargo, no todo el mRNA permanece en estas estructuras, ya que conforme avanza la infección, la producción de mRNA aumenta, superando la capacidad de unión al mRNA de las proteínas virales presentes en los viroplasmos, el mRNA que logra salir de estas estructuras puede ser utilizado para la traducción viral<sup>64</sup>.

Es posible que una misma molécula de RNA viral interaccione con diversas proteínas virales por lo que al sumar los porcentajes de RNA viral asociado a las proteínas virales VP1, VP2, NSP2, NSP3 y NSP5 el resultado se esté sobrevalorando. Sin embargo, también es posible que debido a que varios factores pueden afectar la eficiencia del crosslinking e inmunoprecipitación<sup>60</sup>, y que no se esté cuantificando el 100% de los complejos proteína – mRNA viral producidos durante la infección.

Sin embargo, a pesar de estas posibles deficiencias en el método, los resultados fueron reproducibles y sobretodo, el protocolo de inmunoprecipitación de complejos ribonucleoproteicos permitió cuantificar al mRNA viral unido a las proteínas VP1 y NSP3 bajo diversas condiciones de interferencia y permitió analizar las diferencias obtenidas al cuantificar dichos complejos RNA – proteína formados durante la infección por rotavirus en ausencia de algunas de las proteínas virales.

Debido a que se ha reconocido a VP1 como la RNA polimerasa viral<sup>23</sup> y a que se sabe que interactúa de forma específica con el extremo 3' de los RNAs virales<sup>63</sup>, se ha propuesto que VP1 pudiera estar seleccionando a los mRNAs virales que serán utilizados como plantillas para la replicación viral. Como una forma de comprobar esta hipótesis, inmunoprecipitamos los complejos VP1 – mRNA viral formados al silenciar algunas proteínas virales. Si VP1 está seleccionando al mRNA que será utilizado como plantilla para la replicación viral, entonces deberíamos encontrar una correlación entre el aumento o disminución de la replicación viral y la formación de estos complejos virales. Para comprobar esta hipótesis, analizamos la formación de estos complejos RNA viral – VP1 al silenciar NSP3, debido a que se había reportado que en su ausencia había un incremento de 3 veces en la replicación viral<sup>42</sup>.

Los resultados de este análisis muestran que, al igual que la replicación viral, el total de mRNA unido a VP1 aumentaba tres veces; esto puede deberse a varias razones. La primera es la posible existencia de una competencia entre VP1 y NSP3 por el mRNA



viral, debido a que VP1 y NSP3 interactúan con el extremo 3' de los mRNAs virales<sup>25, 39</sup>. Por esto, al silenciar a NSP3, una mayor cantidad de mRNA viral podría estar disponible para unirse a VP1. Sin embargo, esta hipótesis no parece del todo probable por las siguientes razones: el sitio de localización de NSP3 es citoplásmico mientras que VP1 colocaliza con los viroplasmos<sup>20</sup>, únicamente el 1% y 10 % del total de mRNA viral producido se une a VP1 y NSP3, respectivamente, por lo que se puede pensar que la cantidad de mRNA viral no parece ser una limitante; al silenciar a la proteína viral NSP4, hay un incremento de tres veces en la traducción de NSP3, sin embargo, la cantidad de mRNA viral unido a VP1 no se ve afectada.

La segunda posibilidad para explicar el aumento en la cantidad de mRNA viral asociada a VP1 es que alguna proteína celular sea importante para regular el proceso de replicación viral. Por ejemplo, la proteína viral NSP3 es la responsable de la disminución en la síntesis de proteínas celulares durante la infección<sup>41</sup>, entonces, al silenciar la expresión de esta proteína viral la síntesis de proteínas celulares se reestablece y una mayor cantidad de una posible proteína celular reguladora de la replicación viral podría sintetizarse, trayendo como consecuencia un aumento en la formación del complejo mRNA viral – VP1 y en la replicación viral. Resultados obtenidos en el laboratorio apoyan la hipótesis de la participación de una proteína celular en el proceso de replicación viral ya que cuando se silencia la expresión de los factores de traducción celular eIF4E, eIF4G1, eIF4G2, eIF4A1 y PABP, la replicación de rotavirus disminuye considerablemente (Rubio et al, datos sin publicar).

Es importante mencionar que al silenciar a NSP3 el aumento observado en la cantidad de mRNA viral unido a VP1, no se debe a un aumento en la transcripción viral ya que la cantidad de mRNA viral asociado a VP1, calculada al silenciar la expresión de NSP4, no presentó diferencias significativas cuando se comparó con los resultados obtenidos al cuantificar al mRNA viral unido a VP1 durante una infección control. Estos resultados indican que al silenciar la expresión de NSP3 el aumento en el mRNA viral unido a VP1 es la causa del aumento en la replicación viral y no una consecuencia del aumento en la transcripción viral.

Se ha propuesto que el aumento en la transcripción del mRNA viral al silenciar a NSP4 se debe a que las partículas virales no pueden continuar su migración hacia el retículo endoplásmico y por lo tanto, las DLPs se acumulan en el citoplasma. Debido a

que las DLPs producidas de novo son capaces de producir varias rondas de mRNA viral, una acumulación de estas partículas trae como consecuencia una mayor acumulación de transcritos virales<sup>45, 51</sup>.

El aumento en la transcripción viral y en la síntesis de la proteína viral NSP3 como resultado del silenciamiento de NSP4 tampoco produjo un aumento en la síntesis de proteínas virales. Estos resultados concuerdan con reportes previos, en donde se encontró que NSP3 no es necesaria para la traducción viral<sup>42</sup>.

Si bien no se conoce que proteínas pudieran estar regulando la formación del complejo VP1 – mRNA viral, los resultados obtenidos sugieren que los viroplasma son el sitio de formación de dichos complejos virales, ya que en estudios anteriores, se utilizaron mRNAs virales marcados con Br-UTP (análogo del nucleótido UTP el cual puede incorporarse a un mRNA durante su síntesis in vitro y, posteriormente, ser detectado utilizando anticuerpos específicos) se mostró que la mayoría del mRNA viral era sintetizado dentro de los viroplasma y que éste no era exportado hacia los viroplasma como se había propuesto anteriormente; asimismo, al interferir la expresión de VP7, se encontró que a pesar de que el mRNA es degradado específicamente por la maquinaria de RNAi, la producción de dsRNA no se vio afectada. Estos resultados en conjunto sugieren que hay una poza de RNA viral (quizá protegida por los viroplasma) que no es degradada por la maquinaria de degradación RISC y este mRNA es el que sirve como molde para la replicación viral<sup>64</sup>.

Con el fin de investigar si el mRNA asociado a VP1 puede ser sujeto de la degradación por RISC, lo cual nos daría un indicio de su localización en la célula y daría más elementos para proponer que el mRNA unido a VP1 es el que será utilizado como molde para la replicación, se cuantificó la cantidad de mRNA viral asociado a VP1 tanto del gen 9 (que codifica para VP7) como del gen 10 (que codifica para NSP4) en células donde la traducción de VP7 (gen 9) fue silenciada. Los resultados de esta cuantificación mostraron que la unión del mRNA viral a VP1 no se veía afectada cuantitativamente por efecto del silenciamiento de VP7, mientras que el mRNA del gen 9 unido a NSP3, sí podía ser degradado. Por lo tanto, es probable que la formación del complejo mRNA viral – VP1 se lleve a cabo en los viroplasma, ya que el mRNA presente en estas estructuras no es accesible a la degradación por RISC, asimismo, tanto la mayoría de mRNA viral como de la proteína VP1 se localizan en estas estructuras y

por lo tanto es más fácil y probable que se pueda dar una interacción entre estos componentes en estos sitios subcelulares.

En conclusión, este trabajo de investigación permitió conocer con mayor detalle cuál es el papel de las proteínas estructurales en la replicación, traducción y vida media del mRNA viral. De igual manera se encontró que las interacciones entre VP1 y el mRNA viral regulan la replicación viral, mientras que el complejo NSP3 – mRNA viral no tiene efecto alguno sobre los niveles de traducción viral. Con todos estos resultados en conjunto, se pudo obtener más información sobre la regulación del ciclo replicativo de rotavirus.

## Conclusiones

- La producción de dsRNA y mRNA virales aumenta considerable a las 4 horas post infección. Este aumento es debido a la actividad transcripcional de las DLPs recién ensambladas.
- VP1, VP2, VP3 y VP6 son necesarias para la transcripción y replicación del virus.
- VP2 es importante para la estabilidad del mRNA viral, esto podría explicar porque en ausencia de esta proteína la traducción de los mRNAs virales disminuye considerablemente.
- VP1 es al menos parcialmente responsable de la inhibición de la traducción viral cuando VP6 es silenciada.
- El incremento en la cantidad de mRNA viral asociado a VP1 es la causa del incremento en la replicación viral y no una consecuencia del aumento en la transcripción viral.
- El mRNA viral unido a VP1 no es susceptible de la degradación por el sistema RISC, indicando que posiblemente el complejo VP1 – mRNA viral se encuentre en los viroplasmos.
- La síntesis de proteínas virales no depende de la cantidad de mRNA viral producida durante la infección, ni de la cantidad de mRNA unido a NSP3.

## Perspectivas

- **Estudiar cómo participa VP2 en el proceso de traducción de las proteínas virales.** Los resultados de este trabajo de investigación muestran que en ausencia de VP2 la síntesis de proteínas virales disminuye dramáticamente, así como la vida media del mRNA viral. Sin embargo, el descenso en la vida media no es lo suficientemente rápida como para producir una disminución tan drástica en la traducción de proteínas virales cuando VP2 es silenciada, por lo que es probable que esta proteína pudiera estar involucrada de otra manera en la traducción viral.
- **Investigar la participación de VP3 en el proceso de replicación del genoma viral.** Al silenciar la expresión de VP3 se obtuvo una disminución significativa en la replicación viral, a pesar de que se ha demostrado que *in vitro* VP1 y VP2 son suficientes para replicar a los mRNAs virales y que VP3 no es necesaria para el ensamble de los cores virales.
- **Definir si el mRNA viral asociado a VP1 puede ser utilizado posteriormente para la traducción.** Al silenciar la expresión de VP1 la transcripción viral disminuyó a un 10%. Sin embargo, la síntesis de proteínas virales aumentó aproximadamente un 30%. Esto sugiere que VP1 podría evitar que los mRNAs virales sean utilizados para la traducción, posiblemente al secuestrar al mRNA viral en los viroplasmos o al bloquear la interacción del mRNA con los factores celulares de traducción.
- **Determinar que proteínas celulares pudieran regular la replicación viral.** El silenciamiento de NSP3 trae como consecuencia un aumento de tres veces en la replicación viral y en la formación del complejo VP1 – mRNA viral, a pesar de que la traducción de proteínas virales no se ve afectada. Además, al silenciar la expresión de algunos de los factores celulares de inicio de la traducción, la replicación viral disminuye significativamente, esto sugiere la participación de alguna proteína celular en el proceso de replicación viral.

## Bibliografía

1. Parashar, U.D., Hummelman, E.G., Bresee, J.S., Miller, M.A. & Glass, R.I. 2003. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerging Infect. Dis.* 9, 565-72.
2. Schroeder, B.A., Street, J.E., Kalmakoff, J. & Bellamy, A.R. 1982. Sequence relationships between the genome segments of human and animal rotavirus strains. *J. Virol.* 43, 379-85.
3. Prasad, B.V., Wang, G.J., Clerx, J.P. & Chiu, W. 1988. Three-dimensional structure of rotavirus. *J. Mol. Biol.* 199, 269-75.
4. Pesavento, J.B., Crawford, S.E., Estes, M.K. & Prasad, B.V.V. 2006. Rotavirus proteins: structure and assembly. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 309, 189-219.
5. Estes, M. in Knipe D, Howley P. *Fields Virology* (ed. ) pp. 1917-1974 (Philadelphia: Wolters Kluwer, 2007).
6. Barnett, B.B., Spendlove, R.S. & Clark, M.L. 1979. Effect of enzymes on rotavirus infectivity. *J. Clin. Microbiol.* 10, 111-3.
7. Espejo, R.T., López, S. & Arias, C. 1981. Structural polypeptides of simian rotavirus SA11 and the effect of trypsin. *J. Virol.* 37, 156-60.
8. Keljo, D.J. & Smith, A.K. 1988. Characterization of binding of simian rotavirus SA-11 to cultured epithelial cells. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 7, 249-56.
9. Fiore, L., Greenberg, H.B. & Mackow, E.R. 1991. The VP8 fragment of VP4 is the rhesus rotavirus hemagglutinin. *Virology* 181, 553-63.
10. Graham, K.L., Halasz, P., Tan, Y., Hewish, M.J., Takada, Y., Mackow, E.R. et al. 2003. Integrin-using rotaviruses bind alpha2beta1 integrin alpha2 I domain via VP4 DGE sequence and recognize alphaXbeta2 and alphaVbeta3 by using VP7 during cell entry. *J. Virol.* 77, 9969-78.
11. Guerrero, C.A., Méndez, E., Zárate, S., Isa, P., López, S. & Arias, C.F. 2000. Integrin alpha(v)beta(3) mediates rotavirus cell entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 14644-9.
12. Zárate, S., Cuadras, M.A., Espinosa, R., Romero, P., Juárez, K.O., Camacho-Nuez, M. et al. 2003. Interaction of rotaviruses with Hsc70 during cell entry is mediated by VP5. *J. Virol.* 77, 7254-60.
13. Chemello, M.E., Aristimuño, O.C., Michelangeli, F. & Ruiz, M. 2002. Requirement for vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase activity and Ca<sup>2+</sup> gradient during entry of rotavirus into MA104 cells. *J. Virol.* 76, 13083-7.
14. Sánchez-San Martín, C., López, T., Arias, C.F. & López, S. 2004. Characterization of rotavirus cell entry. *J. Virol.* 78, 2310-8.
15. Cohen, J. 1977. Ribonucleic acid polymerase activity associated with purified calf rotavirus. *J. Gen. Virol.* 36, 395-402.
16. Cohen, J., Laporte, J., Charpilienne, A. & Scherrer, R. 1979. Activation of rotavirus RNA polymerase by calcium chelation. *Arch. Virol.* 60, 177-86.

17. Pizarro, J.L., Sandino, A.M., Pizarro, J.M., Fernández, J. & Spencer, E. 1991. Characterization of rotavirus guanylyltransferase activity associated with polypeptide VP3. *J. Gen. Virol.* 72 ( Pt 2), 325-32.
18. Chen, D., Luongo, C.L., Nibert, M.L. & Patton, J.T. 1999. Rotavirus open cores catalyze 5'-capping and methylation of exogenous RNA: evidence that VP3 is a methyltransferase. *Virology* 265, 120-30.
19. Imai, M., Akatani, K., Ikegami, N. & Furuichi, Y. 1983. Capped and conserved terminal structures in human rotavirus genome double-stranded RNA segments. *J. Virol.* 47, 125-36.
20. Petrie, B.L., Graham, D.Y., Hanssen, H. & Estes, M.K. 1982. Localization of rotavirus antigens in infected cells by ultrastructural immunocytochemistry. *J. Gen. Virol.* 63, 457-67.
21. Petrie, B.L., Greenberg, H.B., Graham, D.Y. & Estes, M.K. 1984. Ultrastructural localization of rotavirus antigens using colloidal gold. *Virus Res.* 1, 133-52.
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. Zeng, C.Q., Wentz, M.J., Cohen, J., Estes, M.K. & Ramig, R.F. 1996. Characterization and replicase activity of double-layered and single-layered rotavirus-like particles expressed from baculovirus recombinants. *J. Virol.* 70, 2736-42.
24. 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.
25. Patton, J.T. 1996. Rotavirus VP1 alone specifically binds to the 3' end of viral mRNA, but the interaction is not sufficient to initiate minus-strand synthesis. *J. Virol.* 70, 7940-7.
26. Gallegos, C.O. & Patton, J.T. 1989. Characterization of rotavirus replication intermediates: a model for the assembly of single-shelled particles. *Virology* 172, 616-27.
27. Kattoura, M.D., Chen, X. & Patton, J.T. 1994. The rotavirus RNA-binding protein NS35 (NSP2) forms 10S multimers and interacts with the viral RNA polymerase. *Virology* 202, 803-13.
28. Bican, P., Cohen, J., Charpilienne, A. & Scherrer, R. 1982. Purification and characterization of bovine rotavirus cores. *J. Virol.* 43, 1113-7.
29. Boyle, J.F. & Holmes, K.V. 1986. RNA-binding proteins of bovine rotavirus. *J. Virol.* 58, 561-8.
30. 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.
31. Zeng, C.Q., Estes, M.K., Charpilienne, A. & Cohen, J. 1998. The N terminus of rotavirus VP2 is necessary for encapsidation of VP1 and VP3. *J. Virol.* 72, 201-8.
32. Patton, J.T. 2001. Rotavirus RNA replication and gene expression. *Novartis Found. Symp.* 238, 64-77; discussion 77-81.
33. Wentz, M.J., Zeng, C.Q., Patton, J.T., Estes, M.K. & Ramig, R.F. 1996. Identification of the minimal replicase and the minimal promoter of (-)-strand synthesis, functional in rotavirus RNA replication in vitro. *Arch. Virol. Suppl.* 12, 59-67.

34. Mathieu, M., Petitpas, I., Navaza, J., Lepault, J., Kohli, E., Pothier, P. et al. 2001. Atomic structure of the major capsid protein of rotavirus: implications for the architecture of the virion. *EMBO J.* 20, 1485-97.
35. Mansell, E.A. & Patton, J.T. 1990. Rotavirus RNA replication: VP2, but not VP6, is necessary for viral replicase activity. *J. Virol.* 64, 4988-96.
36. Lawton, J.A., Estes, M.K. & Prasad, B.V. 1997. Three-dimensional visualization of mRNA release from actively transcribing rotavirus particles. *Nat. Struct. Biol.* 4, 118-21.
37. 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.
38. Afrikanova, I., Fabbretti, E., Miozzo, M.C. & Burrone, O.R. 1998. Rotavirus NSP5 phosphorylation is up-regulated by interaction with NSP2. *J. Gen. Virol.* 79 ( Pt 11), 2679-86.
39. Poncet, D., Aponte, C. & Cohen, J. 1993. Rotavirus protein NSP3 (NS34) is bound to the 3' end consensus sequence of viral mRNAs in infected cells. *J. Virol.* 67, 3159-65.
40. 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.
41. Padilla-Noriega, L., Paniagua, O. & Guzmán-León, S. 2002. Rotavirus protein NSP3 shuts off host cell protein synthesis. *Virology* 298, 1-7.
42. Montero, H., Arias, C.F. & Lopez, S. 2006. Rotavirus Nonstructural Protein NSP3 is not required for viral protein synthesis. *J. Virol.* 80, 9031-8.
43. Ericson, B.L., Graham, D.Y., Mason, B.B. & Estes, M.K. 1982. Identification, synthesis, and modifications of simian rotavirus SA11 polypeptides in infected cells. *J. Virol.* 42, 825-39.
44. Au, K.S., Chan, W.K., Burns, J.W. & Estes, M.K. 1989. Receptor activity of rotavirus nonstructural glycoprotein NS28. *J. Virol.* 63, 4553-62.
45. Silvestri, L.S., Tortorici, M.A., Vasquez-Del Carpio, R. & Patton, J.T. 2005. Rotavirus glycoprotein NSP4 is a modulator of viral transcription in the infected cell. *J. Virol.* 79, 15165-74.
46. 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.
47. 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.
48. 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.
49. López, T., Rojas, M., Ayala-Bretón, C., López, S. & Arias, C.F. 2005. Reduced expression of the rotavirus NSP5 gene has a pleiotropic effect on virus replication. *J. Gen. Virol.* 86, 1609-17.
50. Poruchynsky, M.S. & Atkinson, P.H. 1991. Rotavirus protein rearrangements in purified membrane-enveloped intermediate particles. *J. Virol.* 65, 4720-7.
51. López, T., Camacho, M., Zayas, M., Nájera, R., Sánchez, R., Arias, C.F. et al. 2005. Silencing the morphogenesis of rotavirus. *J. Virol.* 79, 184-92.



52. Chen, D., Zeng, C.Q., Wentz, M.J., Gorziglia, M., Estes, M.K. & Ramig, R.F. 1994. Template-dependent, in vitro replication of rotavirus RNA. *J. Virol.* 68, 7030-9.
53. Vásquez, M., Sandino, A.M., Pizarro, J.M., Fernández, J., Valenzuela, S. & Spencer, E. 1993. Function of rotavirus VP3 polypeptide in viral morphogenesis. *J. Gen. Virol.* 74 ( Pt 5), 937-41.
54. Martin, S.E. & Caplen, N.J. 2007. Applications of RNA interference in mammalian systems. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 8, 81-108.
55. Déctor, M.A., Romero, P., López, S. & Arias, C.F. 2002. Rotavirus gene silencing by small interfering RNAs. *EMBO Rep.* 3, 1175-80.
56. Vende, P., Piron, M., Castagné, N. & Poncet, D. 2000. Efficient translation of rotavirus mRNA requires simultaneous interaction of NSP3 with the eukaryotic translation initiation factor eIF4G and the mRNA 3' end. *J. Virol.* 74, 7064-71.
57. Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-8.
58. Montero, H., Rojas, M., Arias, C.F. & López, S. 2008. Rotavirus infection induces the phosphorylation of eIF2alpha but prevents the formation of stress granules. *J. Virol.* 82, 1496-504.
59. Mingle, L.A., Okuhama, N.N., Shi, J., Singer, R.H., Condeelis, J. & Liu, G. 2005. Localization of all seven messenger RNAs for the actin-polymerization nucleator Arp2/3 complex in the protrusions of fibroblasts. *J. Cell. Sci.* 118, 2425-33.
60. Niranjanakumari, S., Lasda, E., Brazas, R. & Garcia-Blanco, M.A. 2002. Reversible cross-linking combined with immunoprecipitation to study RNA-protein interactions in vivo. *Methods* 26, 182-90.
61. Ayala-Breton, C., Arias, M., Espinosa, R., Romero, P., Arias, C.F. & López, S. 2009. Analysis of the kinetics of transcription and replication of the rotavirus genome by RNA interference. *J. Virol.* 83, 8819-31.
62. Sledz, C.A., Holko, M., de Veer, M.J., Silverman, R.H. & Williams, B.R.G. 2003. Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat. Cell Biol.* 5, 834-9.
63. Patton, J.T. 1995. Structure and function of the rotavirus RNA-binding proteins. *J. Gen. Virol.* 76 ( Pt 11), 2633-44.
64. 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.
65. Bustin, S.A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* 25, 169-93.
66. Johnson, M.A. & McCrae, M.A. 1989. Molecular biology of rotaviruses. VIII. Quantitative analysis of regulation of gene expression during virus replication. *J. Virol.* 63, 2048-55.
67. Stacy-Phipps, S. & Patton, J.T. 1987. Synthesis of plus- and minus-strand RNA in rotavirus-infected cells. *J. Virol.* 61, 3479-84.
68. Johnson, M.A. & McCrae, M.A. 1988. A rapid and sensitive solution hybridisation assay for the quantitative determination of specific viral RNA sequences. *J. Virol. Methods* 22, 247-54.
69. Gamarnik, A.V. & Andino, R. 1998. Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus. *Genes Dev.* 12, 2293-304.

# Analysis of the Kinetics of Transcription and Replication of the Rotavirus Genome by RNA Interference<sup>∇</sup>

Camilo Ayala-Breton, Marisol Arias, Rafaela Espinosa, Pedro Romero,  
Carlos F. Arias, and Susana López\*

*Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, UNAM,  
Cuernavaca, Morelos 62210, Mexico*

Received 4 November 2008/Accepted 17 June 2009

**Rotaviruses have a genome composed of 11 segments of double-stranded RNA (dsRNA) surrounded by three protein layers. The virus contains an RNA-dependent RNA polymerase that synthesizes RNA transcripts corresponding to all segments of the viral genome. These transcripts direct the synthesis of the viral proteins and also serve as templates for the synthesis of the complementary strand to form the dsRNA genome. In this work, we analyzed the kinetics of transcription and replication of the viral genome throughout the replication cycle of the virus using quantitative reverse transcription-PCR. The role of the proteins that form double-layered particles ([DLPs] VP1, VP2, VP3, and VP6) in replication and transcription of the viral genome was analyzed by silencing their expression in rotavirus-infected cells. All of them were shown to be essential for the replication of the dsRNA genome since in their absence there was little synthesis of viral mRNA and dsRNA. The characterization of the kinetics of RNA transcription and replication of the viral genome under conditions where these proteins were silenced provided direct evidence for a second round of transcription during the replication of the virus. Interestingly, despite the decrease in mRNA accumulation when any of the four proteins was silenced, the synthesis of viral proteins decreased when VP2 and VP6 were knocked down, whereas the absence of VP1 and VP3 did not have a severe impact on viral protein synthesis. Characterization of viral particle assembly in the absence of VP1 and VP3 showed that while the formation of triple-layered particles and DLPs was decreased, the amount of assembled lower-density particles, often referred to as empty particles, was not different from the amount in control-infected cells, suggesting that viral particles can assemble in the absence of either VP1 or VP3.**

The family *Reoviridae* includes viruses that have a genome composed of 9 to 12 segments of double-stranded RNA (dsRNA). Rotaviruses belong to the most medically significant genus of the family since they are the main cause of infantile gastroenteritis, causing approximately 500,000 deaths per year in children less than 5 years of age (23). These viruses have a genome composed of 11 segments of dsRNA, which is enclosed in a capsid formed by three concentric layers of protein (33). The innermost layer, formed by VP2, contains the viral genome and 12 copies each of the virus RNA-dependent RNA polymerase (RdRP; VP1) and the guanylyltransferase and methylase enzyme (VP3); these viral elements constitute the core of the virus. The addition of VP6 on top of the VP2 layer produces double-layered particles (DLPs). The outermost layer, characteristic of infectious, triple-layered particles (TLPs), is composed of two proteins, VP4 and VP7.

During or shortly after cell entry, the infecting TLP uncoats, losing the two proteins of the outer layer and yielding a DLP, which is transcriptionally active (14). The nascent transcripts are extruded into the cell's cytoplasm through channels located near the icosahedral fivefold vertices of the particle (32). The viral mRNAs contain 5'-methylated cap structures but lack the poly(A) tails characteristic of most cellular mRNAs (11).

The viral RNA transcripts direct the synthesis of six structural (VP1 to VP4, VP6, and VP7) and six nonstructural (NSP1 to NSP6) proteins (4). In addition to their function as mRNAs, the viral transcripts also serve as RNA templates (positive-strand RNA) for the synthesis of negative-strand RNA to form the dsRNA genome segments. The segmented dsRNA genome of rotaviruses is never detected free in the cytoplasm but is transcribed and replicated within viral capsids by the RdRP. The synthesis of negative-strand RNA has been proposed to occur in perinuclear nonmembranous, electron-dense cytoplasmic structures, known as viroplasm, concurrently with the packaging of positive-strand RNA into core replication intermediate (RI) particles (30). It has been proposed that this process leads to the production of new transcriptionally active, dsRNA-containing double-layered RI particles, which are thought to be responsible for an enhanced second round of transcription, resulting in a second wave of assembly of double-layered RI particles (4). The occurrence of this second round, however, has not been directly demonstrated.

The participation of several viral proteins in the replication process of rotavirus has been studied using different approaches; the characterization of temperature-sensitive mutants underlined the importance of VP1, VP2, and VP3 in the replication process (17, 39). In a different approach, an *in vitro* replication assay was developed (2); in this system it has been observed that VP1 and VP2 are necessary and sufficient to replicate the genome and that no other structural or nonstructural protein was necessary although the lack of genome encapsidation in this system indicated the possible role of other viral proteins

\* Corresponding author. Mailing address: Instituto de Biotecnología, UNAM, Avenida Universidad 2001, Colonia Chamilpa, Cuernavaca, Morelos 62210, Mexico. Phone: 52 777 3291615. Fax: 52 777 3172388. E-mail: susana@ibt.unam.mx.

<sup>∇</sup> Published ahead of print on 24 June 2009.

TABLE 1. Sequence for primers used in this work

Gene	Forward primer (5' → 3')	Reverse primer (5' → 3')	Amplicon (nt) <sup>a</sup>
1	GGACGCCGCACTAGATCAATT	GGTCATCATGCTTTACTGGTTCC	1038–1168
6	CCACTTGGTATCCGACTTTGA	GAATACGTGGACGCATCCTT	1228–1309
10	TCCTGGAATGGCGTATTTTC	GAGCAATCTTCATGGTTGGAA	122–214
10Mut	TCCTGGAATGGCGTATTTTC	GAGCAATCTTCATGGTT <b>CTGC</b>	122–214*
GAPDH	ACCTGACCTGCCGTCTAGAAA	CCTGCTTCACCACTTCTTGAT	783–836
Luciferase	GCCTGAAGTCTCTGATTAAGT	ACACCTGCGTCGAAGATGT	1359–1456

<sup>a</sup> nt, nucleotide; \*, same nucleotide positions of gene 10 primer, with changes indicated in bold.

in coordinating the process of replication and sorting of the RNA segments in equimolar amounts during an infection (24). Finally, the relevance of NSP5 and NSP2 in the replication of the virus has been shown *in vivo* using RNA interference. It was found that genome replication, viral mRNA translation, and viroplasm formation were severely affected in rotavirus-infected cells expressing low levels of NSP5 or NSP2 (1, 16, 35).

In this report we determined the kinetics of replication and transcription of the rotaviral genome during the replication cycle using real-time quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). The role of the proteins that constitute the DLPs (VP1, VP2, VP3, and VP6) in an infected cell was analyzed by silencing the expression of each of these proteins in rotavirus-infected cells. We found that all of them are essential for the replication of the viral genome since in their absence there is little synthesis of viral mRNA, and the second round of transcription does not take place. Interestingly, despite the decrease in transcription when any of the four proteins was silenced, only VP2 and VP6 seem to be important for the translation of the viral proteins, whereas the absence of VP1 and VP3 does not have a severe impact on the translation of viral proteins. The assembly of viral particles in the absence of VP1 and VP3 was assessed by CsCl gradients. As expected, we found that there was little assembly of TLPs and DLPs in the absence of these proteins, but the amount of lower-density particles formed, often referred to as empty particles (to indicate that they are devoid of viral dsRNA), was not different from the quantity in the nonsilenced control, suggesting that the assembly of the viral particles can proceed in the absence of either VP1 or VP3. The stability of a transfected viral exogenous reporter mRNA in uninfected or infected cells was measured by qRT-PCR; when VP2 was silenced, we found a decrease in the half-life of the reporter rotavirus mRNA, suggesting that, besides its role as a capsid protein during the replication process, VP2 might also participate in stabilizing the mRNAs committed to translation.

#### MATERIALS AND METHODS

**Cells and viruses.** The rhesus monkey 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. Rhesus rotavirus RRV was obtained from H. B. Greenberg (Stanford University, Stanford, CA); simian rotavirus SA11 was obtained from H. H. Malherbe, and porcine rotavirus YM was isolated in our laboratory. All rotavirus strains were propagated in MA104 cells as described previously (22).

**Antibodies.** Monoclonal antibodies (MAbs) to VP2 (3A8), VP6 (255/60), and NSP4 (B4) were kindly provided by H. B. Greenberg. MAb HS2 directed to VP4 (21), the rabbit antirotavirus polyclonal serum raised against purified RRV TLPs, the rabbit anti-VP1, and antivimentin serum were produced in our labo-

ratory. Rabbit polyclonal antisera to NSP2 and NSP3 have been described previously (9). Fab fragments to digoxigenin (DIG)-peroxidase were purchased from Roche, Inc. Alexa Fluor 488- and 647-conjugated secondary antibodies were purchased from Molecular Probes (Eugene, OR). Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit polyclonal antibody was from Perkin Elmer Life Sciences (Boston, MA), and horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse immunoglobulin G was from Zymed (San Francisco, CA).

**Real-time PCR.** Reverse transcriptase and PCR primers were designed using the Primer3 software ([http://fokker.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3 WWW\\_slow.cgi](http://fokker.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3 WWW_slow.cgi)). The sequences of the primers used are shown in Table 1. The amplification efficiency of each pair of primers was determined by using the slope value of the standard curve in the following formula: efficiency =  $(10^{(-1/\text{slope})} - 1) \times 100$ . All the primers used had an amplification efficiency greater than 90% (data not shown). To specifically determine the levels of each RNA strand, RT-PCR was performed in two separate steps. The first step was performed using only one of the primers (depending on the strand to be quantitated) in the following mixture: 12.5  $\mu$ l of 2 $\times$  SYBR green Master Mix (Applied Biosystems), 0.125  $\mu$ l of reverse transcriptase (50 U/ $\mu$ l), 0.25  $\mu$ l of RNase inhibitor (20 U/ $\mu$ l), and 1  $\mu$ l of either forward or reverse primer (2.5 pmol/ $\mu$ l), plus RNA (1 ng; boiled for 5 min and chilled on ice) in a total volume of 24  $\mu$ l. The reaction mixture was incubated for 30 min at 48°C, and the reverse transcriptase was inactivated by incubating the samples at 90°C for 10 min and immediately chilled on ice. Then, for the PCR step, 1  $\mu$ l of the complementary primer (2.5 pmol/ $\mu$ l) was added to the reaction mixture (for a final volume of 25  $\mu$ l), and the samples were amplified by PCR in an ABI Prism 7500 Sequence Detector System (Applied Biosystems) with the following thermal protocol: 95°C for 10 min and then 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min, followed by dissociation phase of 60°C to 95°C for 30 min.

A standard curve was generated by amplifying known amounts of dsRNA using either forward or reverse primers (for negative- or positive-strand amplification, respectively), during the RT step. After the PCR amplification, the ABI Prism software was used to set a cutoff line with the obtained fluorescence values (y axis) for all the samples between the logarithmic phases of the amplification curves. Then, the logarithm of concentration of each sample was plotted against the cycle number where the amplification curve of the sample reached the cutoff line (cycle threshold [ $C_T$ ]). The amount of either positive- or negative-strand RNA from unknown samples was determined by extrapolating the  $C_T$  value onto the corresponding standard curve. The amount of negative-strand RNA is referred to as dsRNA (since it is only present in this form), whereas the amount of mRNA was calculated by subtracting the amount of negative-strand RNA from the amount of positive-strand RNA obtained in an assay.

**Relative quantification.** Negative- or positive-strand RNA was amplified, as described above, and the  $C_T$  for each amplified sample was calculated. The relative increase was determined by the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method (15). Data are expressed as the relative difference in either negative- or positive-strand RNA with respect to the total amount of negative-strand RNA present at time zero postinfection (assigning this sample the arbitrary value of 1). GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) mRNA was used as an internal control for all the samples.

**siRNA transfection.** Duplex small interfering RNAs (siRNAs) were obtained from Dharmacon Research (Lafayette, CO), and the target sequences used to knock down VP1, VP2, VP3, VP4, and VP6 genes were previously described (20). As an irrelevant control, a previously reported siRNA to firefly luciferase was used (19). Transfection of siRNAs into MA104 cells was performed as previously described (3). Briefly, the siRNAs were transfected using Lipofectamine (Invitrogen). The transfection mixture was added to confluent cell monolayers and incubated for 8 h at 37°C. After this time, the mixture was removed, and the cells were kept in MEM for 48 h at 37°C prior to virus infection.

**Infection of cells and titration of viral progeny.** Transfected cell monolayers, in 24- or 48-well plates, were infected with 3 focus-forming units of virus per cell and then incubated for 24 h at 37°C. At this time the cells were then lysed by two freeze-thaw cycles, and the lysates were treated with 10 µg/ml of trypsin for 30 min at 37°C. The infectious titers of the viral preparations were obtained by an immunoperoxidase focus assay as described previously (22). Briefly, confluent MA104 cells in 96-well plates were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS), and twofold serial dilutions of the above-mentioned viral lysate were adsorbed to the cells for 60 min at 37°C. After the adsorption period, the virus inoculum was removed, the cells were washed once with PBS, MEM was added, and the infection was left to proceed for 14 h for RRV at 37°C. RRV-infected cells were detected by an immunoperoxidase focus detection assay using a rabbit hyperimmune serum to rotavirus, as described previously (22). The numbers of focus-forming units were counted with the help of a Visiolab 1000 station (Biom, France) as previously reported (10).

**Immunoblots.** Cells were transfected with siRNAs and infected with rotavirus RRV as described above. The cells were lysed with Laemmli sample buffer, and the proteins were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and then transferred to nitrocellulose membranes (Millipore, Bedford, MA). Membranes were blocked with 5% nonfat dried milk in PBS and incubated for 1 h at room temperature with primary antibodies in PBS containing 1% milk, followed by an incubation with secondary, species-specific, horseradish peroxidase-conjugated antibodies or with Alexa Fluor-488- and -647-conjugated secondary antibodies. The peroxidase activity was developed by a Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin Elmer Life Sciences), following the manufacturer's instructions, and the fluorescently labeled antibodies were visualized on a Typhoon Trio (Amersham) and quantified using ImageQuant TL software.

**Immunofluorescence.** MA104 cells grown on glass coverslips were transfected as previously mentioned, and at 48 h posttransfection the cells were infected with RRV at a multiplicity of infection (MOI) of 3. At 8 h postinfection (hpi), the cells were fixed with 2% paraformaldehyde in PBS for 20 min at room temperature. After this time the cells were washed twice with PBS containing 50 mM NH<sub>4</sub>Cl, permeabilized by incubation with PBS-0.5% Triton X-100-50 mM NH<sub>4</sub>Cl for 15 min at room temperature, and washed twice with PBS with gentle swirling. The coverslips were then incubated for 1 h at room temperature with primary antibodies diluted in blocking buffer (50 mM NH<sub>4</sub>Cl, 1% bovine serum albumin [BSA] in PBS) and then rinsed four times with PBS. The coverslips were then incubated with the appropriate Alexa Fluor-labeled secondary antibodies in blocking buffer for 1 h at room temperature. The cells were washed four times with PBS and mounted on glass slides with Fluorep (BioMérieux). The slides were analyzed with a Nikon E600 epifluorescence microscope coupled to a DXM1200 digital still camera (Nikon). The images were then digitally captured and prepared in Adobe Photoshop, version 7.0.

**Radiolabeling, isolation, and analysis of viral particles.** Cells grown in 48-well plates were transfected with siRNAs and infected with rotavirus RRV as described above. At 7 hpi, the medium was replaced by MEM without methionine, supplemented with 25 µCi/ml of Easy Tag EXPRESS-<sup>35</sup>S labeling mix (Dupont-NEN) and incubated for 1 h; after this period the cells were washed and lysed with Laemmli sample buffer. For isolation and purification of viral particles, cells grown in 48-well plates were transfected with siRNAs and infected with rotavirus RRV as described above. At 6 hpi, the medium was replaced by MEM without methionine, supplemented with 25 µCi/ml of Easy Tag EXPRESS-<sup>35</sup>S labeling mix (Dupont-NEN). At 12 hpi the cells were frozen and thawed twice, the viral lysate (from 12 wells/condition) was extracted with Freon 113 (Dupont, Wilmington, DE), CsCl was added to the aqueous phase to obtain a density of 1.36 g/cm<sup>3</sup>, the mixture was centrifuged for 18 h at 35,000 rpm in an SW40Ti rotor, and fractions (400 µl) were collected from the bottom. The protein composition of each fraction was analyzed by SDS-PAGE and autoradiography. A densitometric analysis of the protein bands in the autoradiogram was done using the ImageQuant TL software.

**Preparation of the RNA probe.** To prepare an RNA probe complementary to viral mRNA gene 10, a cDNA copy of RRV gene 10 was amplified using primers T7-10 forward (5'-CGCGGCGCCTAATACGACTCACTATAGGCTTTAAA AGTTCTG-3') and YM10-3' reverse (5'-CAGACCCGGGCCGCGGTACAT TAAGACCGTTC-3'), cleaved with KasI and AvaI, and ligated into the KasI and AvaI sites of plasmid pGEM-3Z (pGEM-NSP4). In this construct, the gene for NSP4 was cloned downstream of the T7 promoter and upstream of the SP6 promoter. This plasmid was linearized with EcoRI, which cleaves gene 10 at nucleotide position 427, and purified by phenol-chloroform extraction and ethanol precipitation. RNA probes were generated by *in vitro* transcription of the linearized plasmid using a Megascript SP6 kit (Ambion) in the presence of DIG-UTP (Roche) according to the manufacturer's instructions. The SP6 poly-

merization mix contained 1 µg of linearized DNA; 5 mM each of ATP, GTP, and CTP; 1.66 mM UTP; and 0.66 mM DIG-UTP. The RNA probe produced was 323 nucleotides in length, and its concentration was determined by spectrophotometry.

**FISH.** To detect by hybridization the RNA segment 10 positive strand, the protocol of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) as previously described by Mingle et al. (18) was followed. Briefly, MA104 cells were grown in coverslips and infected with RRV at an MOI of 3. At 6 hpi cells were fixed with 2% paraformaldehyde in PBS for 15 min at room temperature, washed twice with 50 mM NH<sub>4</sub>Cl in PBS, permeabilized with 0.5% Triton X-100, and incubated for 30 min at room temperature with 1.5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Fixed cells were incubated overnight at 58°C with 120 µl (0.2 ng/µl) of an RNA probe complementary to the positive strand of rotavirus RNA gene 10 (see above) in hybridization buffer (50% formamide, 5× SSC [1× SSC is 0.15 M NaCl plus 0.015 M sodium citrate], 50 mg/ml heparin, 0.1% Tween 20, and 1 µg/ml of total yeast RNA). Then, the cells were washed three times with hybridization buffer at 70°C and three times with 0.1× SSC and blocked with blocking buffer (1% BSA, 0.2% nonfat milk, 0.3% Triton X-100) for 1 h at room temperature. The RNA probe was detected by incubating the cells with a monoclonal anti-DIG antibody conjugated with peroxidase for 1 h at room temperature. After this step, the fluorescence signal for RNA detection was obtained by using the tyramide signal amplification system (TSA-Plus Fluorescence Palette System; Perkin Elmer) as recommended by the manufacturer. For simultaneous protein immunodetection, specific antibodies were used during the anti-DIG antibody incubation (all antibodies were diluted 1:1,000); cells were washed five times with TNT buffer (0.1 M Tris pH 7.5, 0.15 M NaCl, and 0.05% Tween 20), incubated with the corresponding secondary antibody for 1 h at 37°C, and washed five times with TNT buffer. Finally, the cells were mounted on glass slides with Fluorep (Bio Mérieux) and observed as previously described.

**RNA stability assays.** Gene 10 cloned in plasmid pGEM3Z (pGEM-NSP4) was mutagenized at nucleotide position 190 and positions 193 to 196 using a QuikChange kit (Stratagene), and the resultant plasmid (pGEM-NSP4mut) was sequenced to verify the introduced mutations. As a control mRNA, we used a luciferase reporter gene to which an AclI restriction site after the poly(A) tail sequence was introduced by PCR in the luciferase T7 control plasmid (Promega) using the primers T7-forward (5'-TAATACGACTCACTATAG-3') and reverse (5'-AAAAAAAAAAAAAAAAACGTTATTGGCATCACCGG-3'). The resulting PCR product was cleaved with AclI, and blunt ends were generated by micrococcal nuclease digestion. The SacII-linearized pGEM-NSP4mut plasmid and the poly(A)-luciferase PCR product were purified by phenol-chloroform extraction and ethanol purification. The gene 10 segment was positioned such that the T7 transcript derived from plasmid pGEM-NSP4mut (reporter gene 10Mut) digested with SacII was predicted to have the same 5' and 3' terminal ends of the corresponding rotavirus gene 10 sequence (GenBank accession number L41247). Capped RNAs were synthesized using a MegaScript T7 transcription system (Ambion) in the presence of a cap analog (New England Biolabs). The T7 polymerization mixture contained 1 µg of linearized DNA; 7.5 mM each of ATP, CTP, and UTP; 1.5 mM GTP; and 6 mM cap analog (New England Biolabs). RNA was purified by phenol-chloroform extraction, its concentration was determined by spectrophotometry, and aliquots were stored at -80°C.

To measure the half-life of the reporter mRNAs, 1 µg of RNA was transfected for 2 h into 5 × 10<sup>5</sup> MA104 cells, which were left uninfected or were previously infected with rotavirus for 1 h at 37°C, using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). The transfection mixture was removed, and the cells were washed four times with MEM and incubated for 30 min at 37°C with 10 mg/ml RNase A in MEM to remove the extracellular nonspecifically bound RNA. Then, the cells were washed four times with 1% BSA in MEM and four times with MEM and incubated at 37°C for different times. Aliquots of the cells were harvested using Trizol at different times postinfection, and the RNA was purified as previously described. The reporter RNA gene 10Mut and the luciferase RNA were quantitated by real-time RT-PCR as described above, using GAPDH as an internal control. Primer 10Mut (Table 1) was used as a reverse primer to amplify the reporter for gene 10; in control assays this primer did not amplify the wild-type rotavirus gene 10 (data not shown). Primers used to amplify GAPDH and luciferase RNAs are also indicated in Table 1.

## RESULTS

**Standardization of real-time RT-PCR assay for specific quantitation of negative and positive strands of viral RNA.** To determine if it was possible to follow the kinetics of transcription and replication of the rotavirus genome using qRT-PCR,

we standardized a protocol to independently quantify both strands (negative and positive) of the dsRNA produced during a viral infection. A set of primers (Table 1) was designed to amplify rotavirus genes 1, 6, and 10 as representatives of the different sizes of the viral genes (large, medium, and small, respectively). The efficiency of the primers was measured by generating a standard curve from twofold serial dilutions (from 0.05 to 150 ng) of a known amount of rotavirus dsRNA (see Materials and Methods). Given the double-stranded nature of the rotaviral genome, adding both primers to the RT-PCR would result in the amplification of both strands simultaneously. To avoid this problem, only one of the primers (depending on the strand to be quantitated) was used for RT; the complementary primer was added before the PCR was started and after a 10-min denaturation step to eliminate the reverse transcriptase activity. In this way, the cDNA synthesized from only one of the viral RNA strands was quantified.

To test if this assay was specific to quantify each viral RNA strand in a mix of negative and positive strands, a constant amount of viral mRNA (positive-strand RNA) was mixed with serial dilutions of viral dsRNA, and each strand was quantified in separate reactions by qRT-PCR. We found that the amount of negative-strand RNA was equivalent to the amount of dsRNA added and that the difference between positive- and negative-strand RNAs was equivalent to the amount of mRNA added to the reaction mixture (data not shown).

**Kinetics of dsRNA and mRNA accumulation during the virus replication cycle.** Once we established that the real-time RT-PCR assay was sufficiently sensitive and specific to separately quantify the positive and negative strands of the viral RNA, we decided to characterize the kinetics of synthesis of both types of RNAs produced during a 12-h infection course. MA104 cells were infected at an MOI of 0.1 to minimize the possibility of having more than one infecting virus per cell. After the adsorption period, noninternalized virus was washed off, total RNA from infected cultures was harvested every 2 h up to 12 hpi, and the amounts of both viral mRNA and dsRNA from viral segments 1, 6, and 10 were determined by qRT-PCR. The results shown in Fig. 1A and B indicate that while the dsRNA accumulation kinetics for the three RNA segments evaluated seemed equimolar, despite their differences in size, the amount of mRNA accumulated during the infection period was not equimolar. The amount of transcript detected was apparently size dependent since the amount of mRNA from RNA segment 10 produced at 12 hpi was 4.5 and 2 times more abundant than that for RNA segments 1, and 6, respectively, which is in agreement with the results reported by Stacy-Phipps and Patton, who quantitated the total amount of viral mRNA and dsRNA using an electrophoretic system (38). Interestingly, and also as previously reported (38), the amount of mRNA accumulated at 12 hpi was, on average, about six times more abundant than the dsRNA accumulated during that period of time.

To determine if there was a correlation between the production of viral dsRNA and the production of infectious viral particles, MA104 cells were infected as previously described, and the cells were harvested at different times. The viral dsRNA for gene 10 was quantitated by qRT-PCR, and the amount of infectious viral progeny produced was quantitated by an immunoperoxidase focus forming assay (22). The kinet-

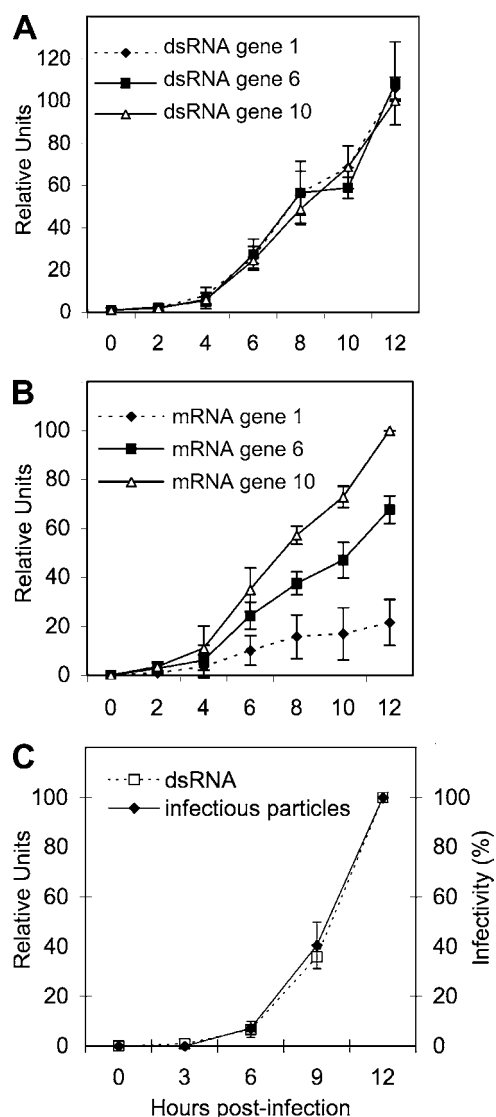


FIG. 1. Kinetics of transcription and replication of the viral RNA. Confluent MA104 cells were infected with RRV at an MOI of 0.1 by adsorption for 30 min at 4°C and then for 30 min at 37°C; the noninternalized virions were washed off with 3 mM EGTA in PBS, and MEM at 37°C was added. At the indicated times postinfection, RNAs were Trizol extracted and quantified by RT-PCR as described in Materials and Methods, or with 0.1% Triton X-100 for infectious virus titration. (A) RT-PCR of the negative strand of genes 1, 6, and 10. (B) Quantitation of the mRNAs corresponding to viral segments 1, 6, and 10. (C) RT-PCR of the negative strand of RNA segment 10 and titration of infectious particles by an immunoperoxidase focus assay as described in Materials and Methods. In panels A and B the qRT-PCR results are expressed as the increase relative to the amount of mRNA or negative strand from RNA segment 10 accumulated at 12 hpi, which was taken as 100%. Data shown represent the arithmetic means  $\pm$  standard deviation of three independent experiments. In panel C data are expressed as percentage of total RNA synthesis or infectious particles produced at 12 hpi, which was taken as 100%. Data shown represent the arithmetic means  $\pm$  standard deviation of three independent experiments.

ics of both assays displayed the same tendency: a slight linear increase during the first 4 h and then a logarithmic increase at later times (Fig. 1C). These results suggest that the assembly of infectious viral particles parallels the replication of the viral genome.

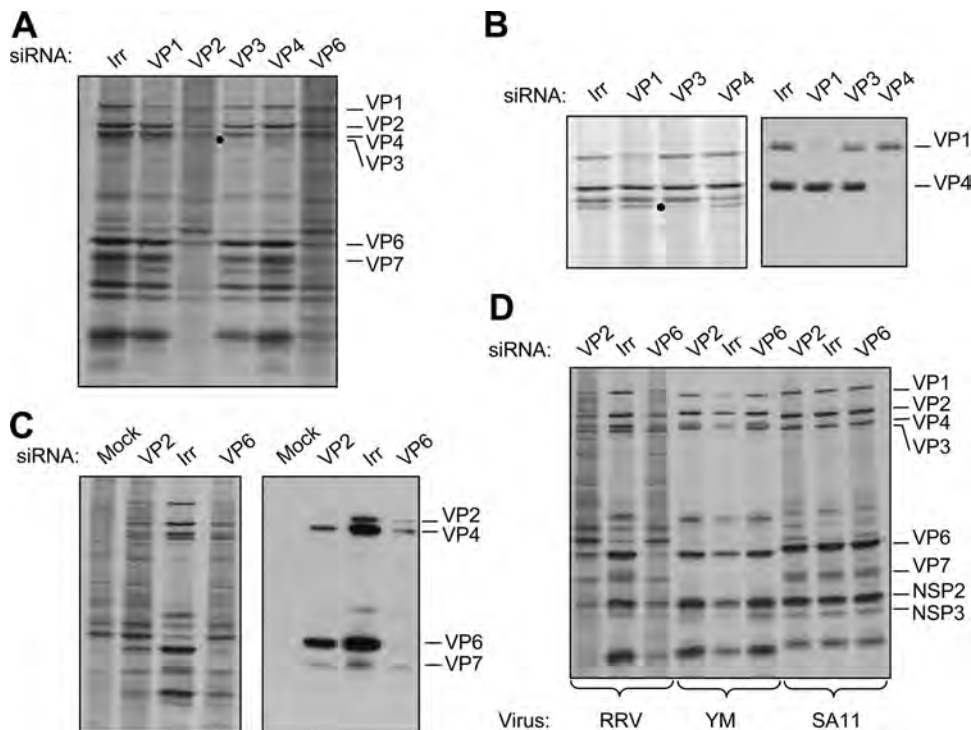


FIG. 2. Silencing the expression of the proteins that form the DLP has a differential effect on viral translation. MA104 cells in 48-well plates were transfected with the indicated siRNA as described in Materials and Methods. At 48 h posttransfection, the cells were infected with RRV at an MOI of 3 (A, B, and C) or with rotavirus strains with RRV, YM, and SA11 (D), and at 7 hpi the cells were radiolabeled for 60 min with 25  $\mu$ Ci/ml of Easy-tag Express-<sup>35</sup>S and then lysed. The labeled proteins were resolved by SDS-10% PAGE (A, B, and D) or by SDS-7% PAGE (B) and detected by autoradiography (left panels) or by immunoblot analysis (right panels) using either a mixture of antibodies to VP1 and VP4 (B) or a polyclonal antirotavirus antibody (C). Irr, irrelevant control siRNA.

**Role of VP1, VP2, VP3, and VP6 in the viral replication cycle. (i) siRNAs directed to the DLP proteins specifically knock down their expression.** To study the role of DLP proteins in the transcription and replication of the viral genome during infection and to determine if it was possible to experimentally dissociate these two events, we silenced the expression of VP1, VP2, VP3, VP4, and VP6 by RNA interference. The cells were transfected with siRNAs that target each one of the above-mentioned RRV genes or with an siRNA complementary to the firefly luciferase gene as an irrelevant control. In these assays, MA104 cells were transfected with each siRNA, infected with rotavirus RRV at 48 h posttransfection, and metabolically labeled for 60 min at 7 hpi. The synthesis of viral and cellular proteins was assessed by SDS-PAGE and autoradiography (Fig. 2). The knockdown of every viral protein was apparent in the autoradiography shown in Fig. 2A. The effectiveness of each siRNA was also confirmed by Western blot analysis using specific antibodies against VP1, VP2, VP6, and VP4, which was used as a silencing control (Fig. 2B and C). The silencing of VP3 was assessed only by SDS-7% PAGE of <sup>35</sup>S-labeled infected cells since specific antibodies against this protein were not available (Fig. 2B). When VP1 was silenced, a cellular protein that comigrates with VP1 was apparent in the autoradiogram shown in Fig. 2A and B; however, the Western blot with an antibody against VP1 confirmed that this protein was efficiently silenced.

Silencing the expression of the VP1, VP3, and VP4 genes did

not affect significantly the amount of total viral protein synthesized, as we have previously observed (20). In contrast, silencing the expression of the VP2 and VP6 genes caused a general reduction in the synthesis of the viral proteins, which also correlated with an increased synthesis of cellular proteins (Fig. 2A).

It has been reported that some siRNAs can activate the interferon system, causing a nonspecific inhibition of cell protein synthesis (31, 37). Since the effect of the siRNAs directed to VP2 and to VP6 was more severe than expected, we analyzed the effect of these two siRNAs on cells infected with two different strains of rotavirus, a porcine rotavirus (YM) and a simian rotavirus (SA11), so that we could discard the possibility that these two siRNAs induced a nonspecific, generalized shutoff of protein synthesis. The sequences of the VP6 and VP2 genes from these two strains differ in 4 nucleotides and more than 10 nucleotides, respectively, from the sequences of the siRNAs used to knock down the expression of the corresponding RRV genes. Figure 2D shows that while the siRNAs to VP2 and VP6 almost completely inhibited the synthesis of RRV viral proteins, they did not affect the synthesis of any of the YM and SA11 proteins, indicating that the effect observed with the siRNAs directed to RRV VP6 and VP2 was specific and did not directly affect any other cellular or viral targets.

**(ii) Silencing the expression of DLP proteins decreases the yield of infectious virus.** We then tested the effect of knocking down the expression of the DLP proteins on the pro-

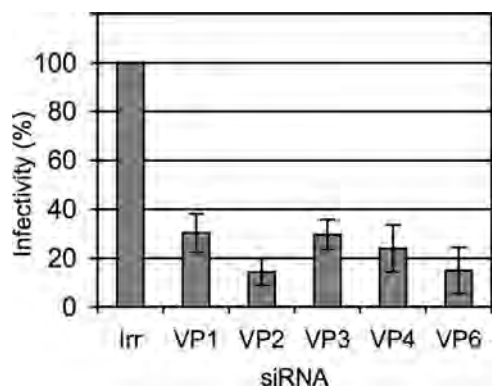


FIG. 3. The yield of infectious progeny virus is decreased in cells expressing low levels of VP1 to VP6. MA104 cells in 48-well plates were transfected with the indicated siRNAs, and at 48 h posttransfection the cells were infected with RRV at an MOI of 3. The cells were harvested at 12 hpi, and the infectious virus produced was determined by an immunoperoxidase assay, as described in Materials and Methods. Data are expressed as the percentage of the infectivity obtained when the cells were transfected with an irrelevant (Irr) siRNA. Data shown represent the arithmetic mean  $\pm$  standard deviation of three independent experiments.

duction of infectious rotavirus progeny. siRNAs directed to VP1 to VP6 were transfected into MA104 cells, and 48 h after transfection the cells were infected with rotavirus RRV; 12 h later the progeny virus produced under these conditions was recovered, and its titer was determined by a focus-forming assay. Transfection with any of the siRNAs tested decreased the yield of viral progeny by about 80% while the irrelevant siRNA used as control did not affect the production of virus (Fig. 3). The inhibition of RRV viral yield by the siRNAs to VP2 and VP6 was shown to be specific since these siRNAs did not affect the production of infectious viral particles when the same assay was performed with the porcine rotavirus YM or the simian rotavirus SA11 (data not shown).

**(iii) Viroplasm formation is not impaired when the DLP proteins are knocked down.** Viroplasms are electron-dense, nonmembranous structures that form upon rotavirus infection. It has been shown that viroplasms contain the proteins that constitute the DLPs, the viral RNA, and the nonstructural proteins NSP2 and NSP5 that are sufficient to form these structures when transiently expressed in transfected cells (5). To determine if, besides these two nonstructural proteins, any of the DLP proteins was necessary to form viroplasms in an infected cell, we used immunofluorescence to detect viroplasms in MA104 cells in which VP1, VP2, VP3, or VP6 was silenced. We found that viroplasms were formed in all cases irrespective of the siRNA used; however, the number and size of the viroplasms varied depending on the protein silenced (Fig. 4). When the expression levels of VP2 and VP6 were knocked down, the viroplasms appeared smaller and there were fewer of them than in control transfected cells. The siRNA directed to VP3 resulted in the formation of fewer but larger viroplasms. In general, even though the morphology and size of these structures varied depending on the protein silenced, none of these proteins seems to be essential for the formation of the viroplasms.

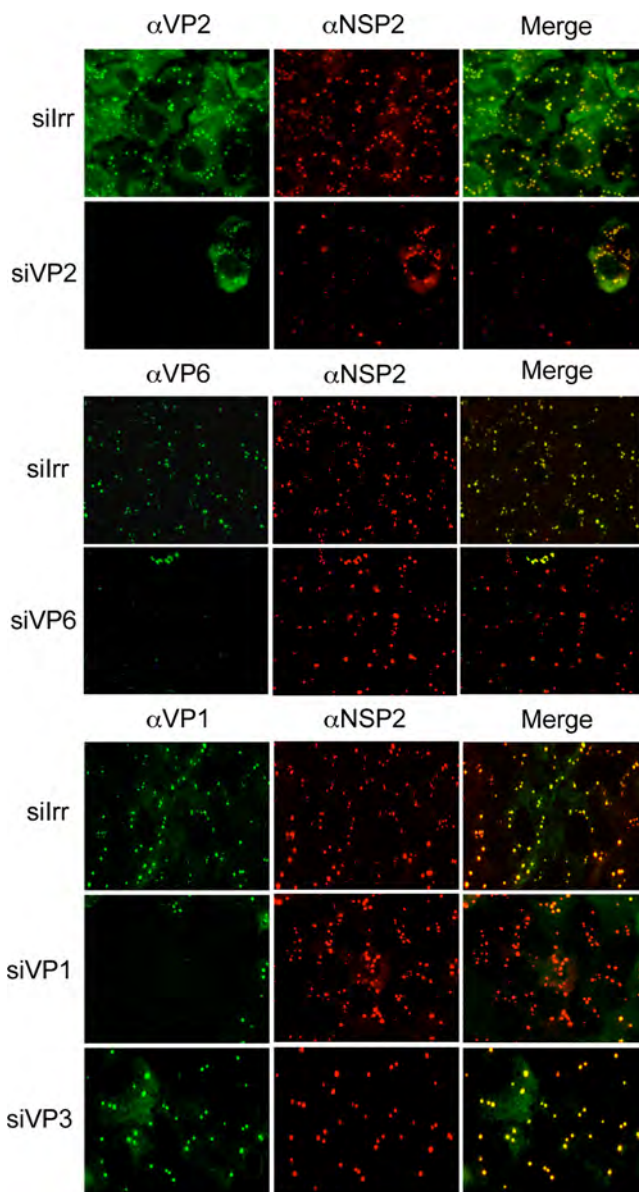


FIG. 4. The formation of viroplasms is not impaired when the DLP proteins are knocked down. MA104 cells grown in coverslips were transfected with the indicated siRNAs; at 48 h posttransfection the cells were infected with RRV, and at 8 hpi the cells were fixed and immunostained as indicated in Materials and Methods. Antibodies against VP1, VP2, and VP6 were used, depending on the siRNA used, to assess the silencing of the corresponding protein of interest; antibodies to NSP2, VP6, and VP2 were used as markers of viroplasm formation, as indicated.  $\alpha$ , anti-; siIrr, irrelevant siRNA.

**(iv) The synthesis of viral mRNA and dsRNA is inhibited when the expression of any of the DLP proteins is knocked down.** Once the qRT-PCR method was standardized and once the kinetics of accumulation of viral dsRNA and mRNA during a rotavirus infection was determined (Fig. 1), we decided to analyze the effect of silencing the expression of the DLP proteins in the synthesis of viral mRNA and dsRNA. MA104 cells were transfected with the siRNAs directed to VP1, VP2, VP3, or VP6; 48 h later the cells were infected with RRV, and total

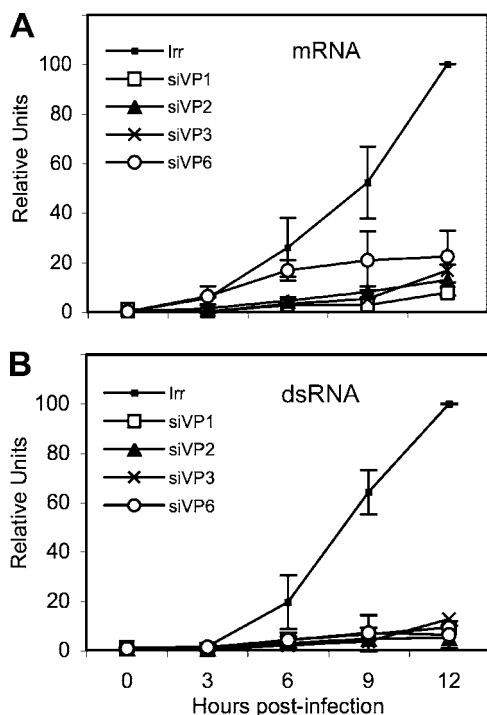


FIG. 5. Kinetics of transcription and replication of the viral RNA in the absence of the DLP proteins. Confluent MA104 cells were transfected with the siRNAs directed to VP1, VP2, VP3, or VP6 (designated as siVP1, for example), as indicated, and 48 h later the cells were infected with RRV at an MOI of 0.1 for 1 h at 37°C; the noninternalized virions were washed off with 3 mM EGTA in PBS, and at the indicated times postinfection, RNAs were Trizol extracted and quantified by RT-PCR as described in Materials and Methods using primer pairs specific for gene segment 10. (A) RT-PCR of the mRNA corresponding to viral segment 10. (B) Quantitation of the negative strand of gene 10. The qRT-PCR results are expressed as the increase relative to the amount of mRNA or negative strand produced in cells transfected with the control siRNA, which was taken as 100%. Data shown represent the arithmetic means  $\pm$  standard deviation of three independent experiments.

RNA was harvested with Trizol at different times postinfection. The amount of viral mRNA and dsRNA from viral segment 10 (which was used as a reporter gene) was determined by qRT-PCR as described above. Knocking down the expression of either VP1, VP2, VP3, or VP6 resulted in a marked decrease in the production of both dsRNA and mRNA (Fig. 5), which was more evident after 3 hpi, when there was a change in the kinetics of accumulation of RNA from being linear to an almost logarithmic increase. At 12 hpi the amount of dsRNA detected was about 1/10 of the amount of dsRNA produced in infected cells transfected with an irrelevant siRNA; a similar decrease in the amount of mRNA was detected when the expression of any of the DLP proteins was silenced. To discard the possibility that the mRNA and dsRNA from segment 10 behaved differently from the rest of the viral genes (given the fact that this mRNA, which encodes NSP4, is translated in the rough endoplasmic reticulum), we also determined the accumulation kinetics of the mRNA and dsRNA from gene segment 6 in cells in which either VP1 or VP2 was silenced. The results obtained using gene segment 6 were very similar to those found for gene segment 10 (data not shown),

suggesting that the accumulation kinetics of at least these two genes are similar, irrespective of their site of translation.

**Reduced levels of VP1 or VP3 decrease the formation of DLPs and TLPs, whereas the amount of low-density particles remains similar.** Since the synthesis of viral proteins was not affected when either VP1 or VP3 was silenced, we evaluated the effect of the absence of these proteins on virus particle assembly. For this, cells transfected with either a control siRNA or with siRNAs to VP1 and to VP3 were infected with RRV and labeled with an  $^{35}\text{S}$  labeling mix, and at 12 hpi the virus particles produced were purified by CsCl density gradients. The gradients were fractionated, and the protein composition of each fraction was analyzed by SDS-PAGE and autoradiography (Fig. 6A). The protein distribution obtained from the gradient of the control transfected cells shows that the DLPs and TLPs are distributed in fractions 4 to 6 while lower-density particles, also referred to as empty particles, are distributed near the top of the gradient in fractions 10 and 11. When the fractions from the gradients where VP3 or VP1 (not shown) were silenced, a decrease in the amounts of viral proteins present in the fractions corresponding to DLPs or TLPs was apparent while the viral proteins present in the upper fractions did not seem to be affected. To quantify this observation, the amount of VP6 in each fraction was determined by densitometry, and the amount of viral RNA present in fractions 6 and 10 was also determined by qRT-PCR (Fig. 6B).

Typically, density gradients of rotavirus particles yield two bands near the middle of the tube that correspond to DLPs and TLPs (3) and two additional lighter bands near the top of the gradient that contain particles with a protein composition very similar to DLPs and TLPs but devoid of dsRNA. In the experiments shown here, the viral proteins were labeled with  $^{35}\text{S}$ , and the gradients were fractionated and analyzed by gel electrophoresis. Figure 6A shows a representative PAGE gel of the gradient fractions obtained from a control infection and of an infection where VP3 was silenced. The amounts of TLPs produced when VP3 was knocked down were decreased by about 70% compared to the control transfected cells while the amount of protein present in the lighter fractions stayed in similar proportions. When the RNA present in the TLPs obtained from cells with knocked down expression of VP1 or VP3 was quantified, a similar result was obtained (Fig. 6B). Interestingly, when the amount of positive and negative strands of RNA segment 6 were quantified in the upper bands of the control infection, it was found that there was about seven times more positive- than negative-strand RNA, suggesting that at least part of these lighter particles are associated to transcripts of positive polarity. The amount of plus-sense gene 6 RNA present in the low-density particles from the conditions where VP1 or VP3 was silenced was reduced to about 8% and 6%, respectively, compared to the corresponding fractions of the control infection. Figure 6C shows an autoradiography of a 7% PAGE gel in which fractions 10 and 11 of each gradient were analyzed. The decreased amounts of VP1 and VP3 demonstrate the effectiveness of the siRNA treatment and also show that low-density particles can be assembled in the absence of either protein.

**Cosilencing VP1 and VP6 partially restores the translation of viral proteins.** The finding that viral protein synthesis was differently affected when VP1, VP2, VP3, or VP6 was knocked



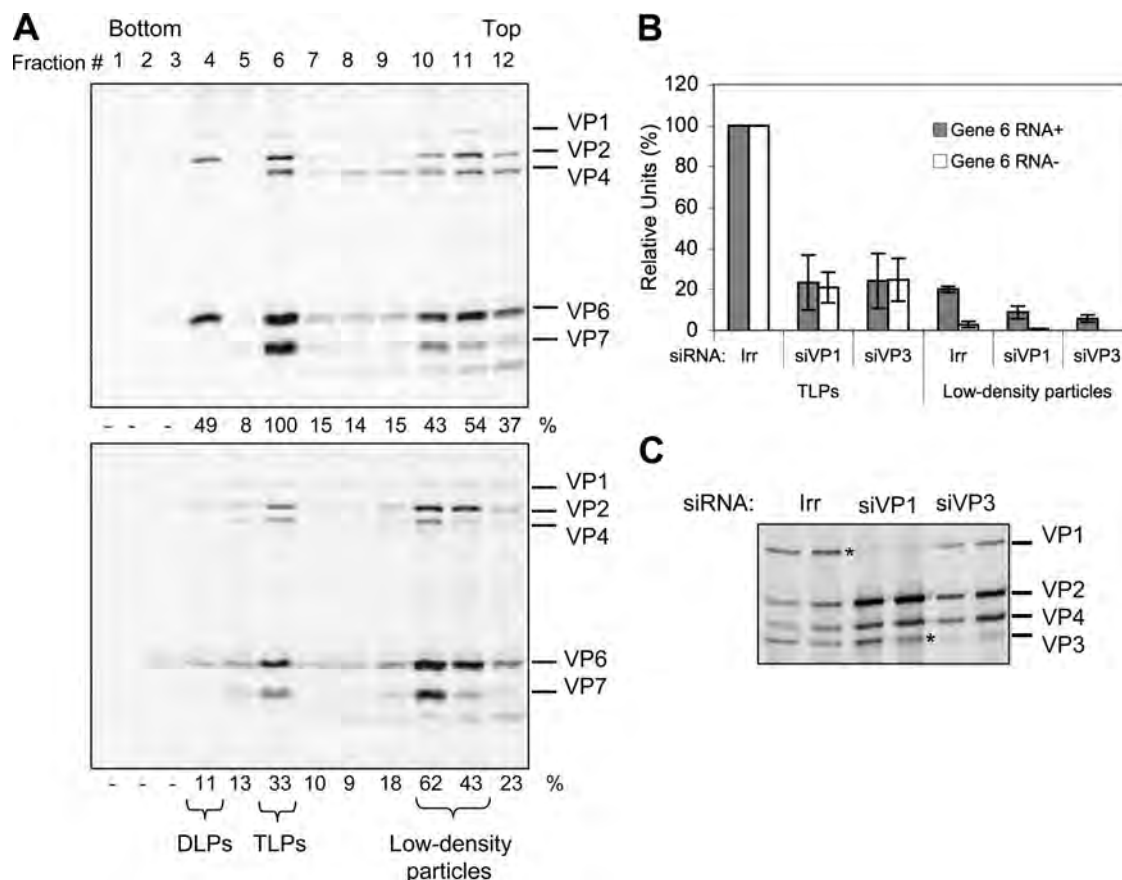


FIG. 6. Reduced levels of VP1 or VP3 decrease the formation of DLPs and TLPs, whereas the amounts of low-density particles remain similar. MA104 cells were transfected with the indicated siRNAs, and at 72 hpi the cells were infected with RRV at an MOI of 3. At 6 hpi cells were radiolabeled for 6 h with 25  $\mu$ Ci/ml of Easy-tag Express- $^{35}$ S and then harvested. Viral particles from each condition were separated by CsCl gradients (see Materials and Methods). Twelve 400- $\mu$ l fractions were collected from each gradient and analyzed by PAGE and autoradiography (A). The amount of VP6 present in each fraction was calculated by densitometric analysis. The numbers below each lane represent the relative amounts of VP6 with respect to the amounts of VP6 present in the TLP fraction of the control gradient, which was taken as 100%. (B) Total RNA from the TLPs and low-density particle fractions was Trizol extracted and quantified by qRT-PCR as described in Materials and Methods using primer pairs specific for the positive (Gene 6 RNA+) and negative (Gene 6 RNA-) strands of rotavirus gene segment 6. The qRT-PCR results are expressed as the increase relative to the amount of positive or negative strand found in the TLP fraction produced in cells transfected with the control siRNA, which was taken as 100%. Data shown represent the arithmetic means  $\pm$  standard deviation of three independent experiments. (C). Fractions 10 and 11 (low-density particles) from gradients of the indicated conditions were resolved by SDS-7% PAGE and detected by autoradiography. An asterisk indicates the position of the silenced proteins. For siRNAs, siVP1 represents the siRNA directed against VP1; other designations follow the same form. Irr, irrelevant control siRNA.

down, despite the fact that the amount of viral mRNA synthesized in the infected cells was small and that the quantity was very similar in all cases, was unexpected. It has been proposed that during infection VP1 and VP3 bind to the 3'- and 5'-terminal ends of viral mRNAs, respectively (26, 27) and that, in turn, these interactions favor the formation of a core RI containing VP1, VP2, and VP3 that precludes the replication of the RNA. One possible explanation of the results previously described could be that when the expression of VP2 or VP6 is knocked down, the viral mRNAs may still be bound by VP1 and VP3; thus, the translation of the viral mRNAs would be prevented, and they could not be replicated in the absence of VP2 or VP6. On the other hand, in the absence of either VP1 or VP3, the viral mRNAs could not be bound to form the precore RI, and thus the mRNAs would remain available for translation. If this were the case, it would be expected that silencing the expression of either VP1 or VP3 in combination

with either VP2 or VP6 would result in the partial rescue of viral protein synthesis. To test this hypothesis, cells were transfected with combinations of siRNAs directed to VP1 and VP2 or to VP1 and VP6; 48 h later the cells were infected, and the amount of viral protein synthesis was assessed by autoradiography of  $^{35}$ S-labeled lysates (Fig. 7A) and by densitometric analysis of Western blots (Fig. 7B). We found that viral protein synthesis was severely inhibited in cells where VP2 was silenced either alone or in combination with VP1. In contrast, the translation of viral protein synthesis was partially restored when VP6 was silenced in combination with VP1.

**Viral mRNA is more stable in infected cells.** Since the efficient translation of the viral proteins was not restored when either VP1 (Fig. 7) or VP3 (data not shown) was silenced in VP2-knockdown cells, it could be possible that the inhibition of viral protein synthesis in VP2-silenced cells is due to a decreased stability of the viral mRNAs. To test this possibility, we

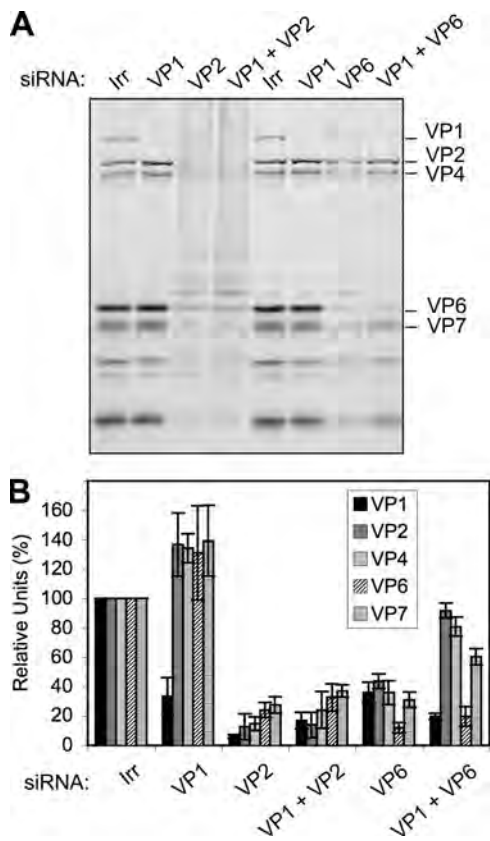


FIG. 7. Cosilencing VP1 and VP6 partially recovers the translation of viral proteins. Cells were transfected with a mixture of siRNAs against VP1 and either VP6 or VP2, as indicated, and 48 h later they were infected with RRV at an MOI of 3. At 7 hpi cells were radiolabeled for 60 min with 25  $\mu$ Ci/ml of Easy-tag Express-<sup>35</sup>S and then lysed. Protein synthesis was visualized by autoradiography (A) or proteins were transferred to a nitrocellulose membrane for Western blot assays using MAb 3A8 to stain VP2 and polyclonal rabbit antibodies to VP1 and TLPs. As secondary antibodies, Alexa Fluor-conjugated antibodies were used. (B) The relative amount of each viral protein was calculated by densitometry of the fluorescent bands using ImageQuant TL software (Amersham Biosciences), and it is expressed as a percentage of the corresponding protein obtained when the irrelevant control siRNA(Irr) was used, which was taken as 100%. Data represent the arithmetic means  $\pm$  standard deviation of at least three independent experiments.

measured the half-life of viral mRNAs in rotavirus-infected cells. Since it is not possible to completely stop viral transcription in an infected cell and since, therefore, it is not possible to reliably measure the decay of viral mRNAs using a radioactive method, we measured the stability of a reporter viral mRNA using qRT-PCR. In this case we measured the half-life of an in vitro T7 transcript of RRV gene 10 containing bona fide viral 5'- and 3'-terminal ends (see Materials and Methods). We also introduced into this construct five changes at nucleotide position 190 and positions 193 to 196 that allowed the differential amplification of this in vitro transcript using a reverse primer (Table 1, 10Mut) that hybridized specifically with the mutant transcript and not with the endogenous wild-type gene 10 mRNA (data not shown). The in vitro transcribed RNA was transfected into mock-infected or RRV-infected cells, the excess of noninternalized RNA was removed by RNase A

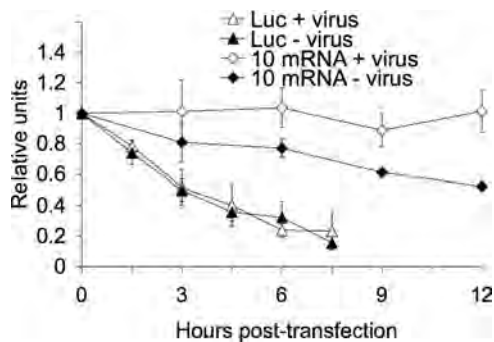


FIG. 8. Rotavirus mRNA half-life increases in infected cells. MA104 cells ( $5 \times 10^5$  cells/assay) were infected (+ virus) or not (- virus) with RRV at an MOI of 3. At 1 hpi, 1  $\mu$ g of either luciferase (Luc) or gene 10 reporter mRNA was transfected using Lipofectamine 2000 for 2 h. At the indicated times posttransfection, cells were lysed, and the transfected mRNAs were quantified by RT-PCR using primers for luciferase or the reporter gene 10Mut (Table 1), as described in Materials and Methods. The half-lives of the exogenous capped RNAs were calculated by a linear regression analysis of the results from the qRT-PCR at different times posttransfection. The half-life of rotavirus gene 10 mRNA in mock-infected cells was about 12 h, while in infected cells no significant decay was observed during the 12 h of the assay. The luciferase mRNA half-life (240 min) remained the same in uninfected cells and cells infected with rotavirus. Data represent the arithmetic means  $\pm$  standard deviation of three independent experiments.

treatment, total RNA was harvested at different times posttransfection, and the mutant transcript was quantified by qRT-PCR. As a control we used an in vitro transcribed firefly luciferase gene that contained cap at the 5' end and a poly(A) tail at its 3' end. The primers used to quantitate this gene are shown in Table 1. We found that the reporter viral mRNA had a half-life of about 12 h in uninfected cells while it remained essentially undegraded during the 12-h assay period when transfected in rotavirus-infected cells (Fig. 8). According to this method, the half-life of the control luciferase mRNA was about 240 min (Fig. 8), in agreement with previous reports (6), and it did not change in RRV-infected cells, suggesting that the change in stability observed for the gene 10 reporter viral mRNA was virus specific.

**The core protein VP2 is involved in the stability of viral mRNAs.** To determine if the stability of the reporter viral mRNA depended on the presence of some of the DLP proteins, we silenced the expression of VP1, VP2, VP3, or VP6 and determined the half-life of the reporter viral mRNA by RT-PCR. In these experiments MA104 cells were transfected with the siRNAs directed to the DLP proteins, and 48 h later the cells were infected with RRV. At 2 hpi the reporter gene 10Mut mRNA was transfected, and its stability was determined by qRT-PCR. We found that the half-life of the reporter was the same in the cells that were transfected with the siRNAs directed to VP1, VP3, and VP6 as the half-life obtained in the control transfected cells (Fig. 9A). Interestingly, the stability of the reporter gene 10Mut decreased in the cells where VP2 was silenced, in which at 9 hpi there was about 50% less reporter gene 10Mut than in the control transfected cells. These results suggest that in the absence of VP2 or with only small amounts of VP2, the viral mRNAs are less stable in MA104 cells.

To further confirm this result, we performed a FISH assay to

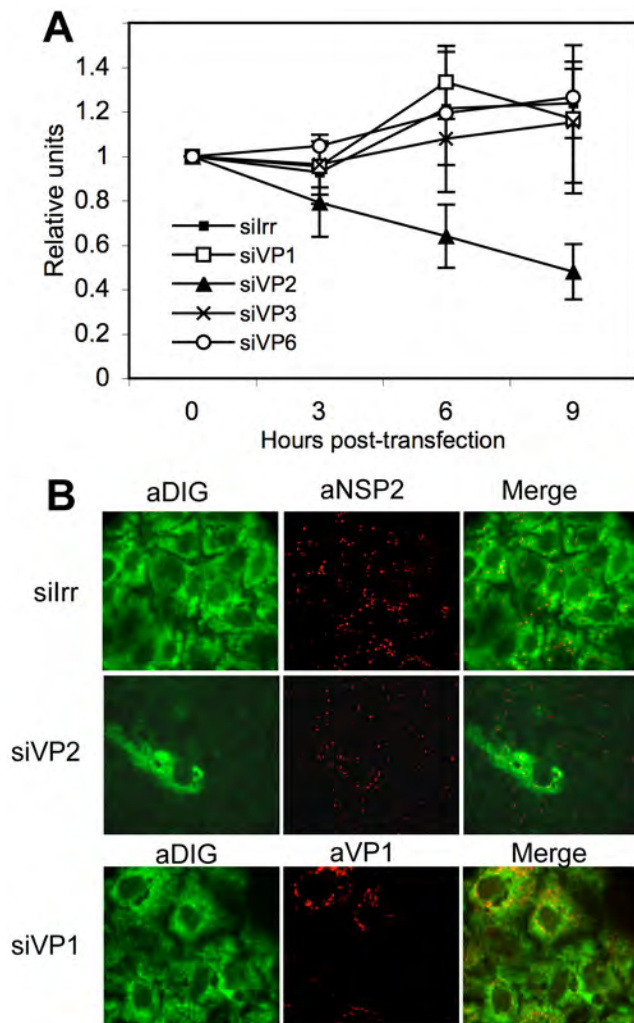


FIG. 9. VP2 has a role in the stability of viral mRNA. (A) MA104 cells in 24-well plates were transfected with the indicated siRNAs, and at 48 hpi the cells were infected with RRV at an MOI of 3. At 1 hpi, 1  $\mu$ g of gene 10 reporter mRNA was transfected using Lipofectamine 2000 for 2 h. At the indicated times after RNA transfection, cells were lysed, and the transfected mRNA was quantified by RT-PCR using primers for reporter gene 10Mut (Table 1), as described in Materials and Methods. The half-life of the transfected RNA was calculated using a linear regression of the results of qRT-PCR at the different times posttransfection. The half-life of rotavirus gene 10 mRNA in cells transfected with an irrelevant siRNA (siIrr) and siRNAs directed against VP1 (siVP2), VP3 (siVP3), and VP6 (siVP6) was longer than 12 h. The half-life of rotavirus mRNA when in cells transfected with the siVP2 was about 9 h. (B) MA104 cells grown in coverslips were transfected with the indicated siRNAs; at 48 h posttransfection the cells were infected with RRV, and at 6 hpi the cells were fixed, permeabilized, and hybridized with a DIG-labeled RNA probe as indicated in Materials and Methods. Viral proteins or bound probe were detected using the indicated antibodies (indicated by the a- prefix; diluted 1:1,000) and secondary Alexa Fluor-conjugated antibodies. The fluorescence signal corresponding to the bound probe was developed using a tyramide signal amplification system (Perkin Elmer).

visualize the cellular distribution of the viral mRNA. In these experiments, MA104 cells were transfected with the siRNAs to VP1 or VP2, infected with RRV, and fixed and hybridized with a DIG-labeled RNA probe that was complementary to the

3'-terminal 300 nucleotides of gene 10. At the same time the cells were immunostained with antibodies directed to viral proteins to observe the formation of viroplasm. Figure 9B shows that while the viral RNA was homogeneously distributed in the cytoplasm of infected cells transfected with a control siRNA or with the siRNA directed to VP1, there was almost no detectable RNA in the cells where VP2 was silenced even though the presence of viroplasm was clear (thus confirming that the cells were infected). The panel where the siRNA directed to VP2 was used shows one cell in which probably VP2 was not silenced, and this single cell indeed shows the presence of viral RNA throughout the cytoplasm in contrast to the surrounding cells in which no hybridization signal was detected. The same results were obtained when a DIG-labeled RNA probe complementary to the 3'-terminal nucleotides of gene 6 were used for the FISH assays (data not shown). These assays confirm the previous results indicating that the presence of VP2 is important for the stability of the viral mRNA.

## DISCUSSION

The kinetics of replication and transcription of the rotaviral RNA during the replicative cycle of the virus have been investigated in the past using radioactively labeled viral RNA and either a hybridization assay in solution or PAGE under conditions that allowed the separation of viral dsRNA from mRNA (12, 38). When characterizing the production of different mRNA segments from rotavirus UK, Johnson and McCrae (12) found that at 8.5 hpi there were more RNA-positive molecules for RNA segment 1 than for RNA segment 10 while the levels of accumulation of mRNA of RNA segment 6 and gene 10 were the same. They also found that the production of the 11 dsRNA segments was not equimolar. On the other hand, Stacy-Phipps and Patton found that there was an equimolar production of all the dsRNA segments during the infection of rotavirus SA11 while the transcription seemed to be size dependent (38).

In this work we used a sensitive qRT-PCR protocol to quantify rotavirus mRNA and dsRNA. This method has been previously used to detect and quantify rotavirus load, detecting as few as 10 RNA molecules per reaction (7, 34). In order to establish in more detail the kinetics of rotavirus mRNA and dsRNA production during the infection process, we adjusted the qRT-PCR protocol to differentially quantify the positive and negative viral RNA strands. When analyzing the kinetics of viral mRNA and dsRNA of rotavirus RRV, we found that there was apparently a size-dependent transcription that corresponded to the difference in sizes of the genes, at least for the three RNA segments analyzed. We also found that the synthesis of dsRNA was equimolar at all times for the genes quantified. In fact, a controlled replication of the viral RNA segments has been supported by *in vitro* and *in vivo* experiments (28).

Despite the differences in the amounts of mRNAs transcribed from the different viral genes, it is clear that the kinetics of viral mRNA and dsRNA production followed a characteristic and similar pattern: there was a small linear increment of plus- and minus-strand RNA during the first 4 hpi and then a logarithmic increase at later times of infection. This behavior suggests that the entering infectious particles begin to produce

a small amount of mRNA, which is translated and replicated (since a small increase in the dsRNA accumulation and infectious progeny was detected as early as 4 hpi); as soon as new DLPs are assembled, these particles begin to transcribe their genomes, initiating a secondary wave of transcription that increases considerably the amount of viral mRNA and dsRNA. This idea is supported by the observation that when any of the viral proteins that constitute the DLP (VP1, VP2, VP3, and VP6) is knocked down, the synthesis of plus- and minus-strand RNA remained linear throughout the infection course, and the logarithmic increase in RNA synthesis observed in the control cells was absent. Taken together, these results directly demonstrate the existence of a second wave of RNA transcription and replication carried out by newly assembled DLPs. Even though this second wave has been presumed to exist for a long time, direct evidence for its occurrence was lacking.

Silencing the expression of the DLP proteins also allowed us to study their role during the replication cycle of the virus. The importance of these structural proteins has been previously assessed using *in vitro* replication assays and through the characterization of the phenotype of temperature-sensitive mutants. By means of these strategies, it was shown that VP1 and VP2 are necessary and sufficient to replicate the viral RNA in a cell-free system using baculovirus-expressed proteins (29). However, the newly synthesized dsRNA was not packaged, even when VP3 was added to the assay, so it was concluded that, *in vivo*, some other viral proteins, such as NSP2 and NSP5, should be needed for the encapsidation process and/or for the selection of the RNAs to be replicated. Using a temperature-sensitive virus with a lesion in VP3, Vásquez et al. (39) demonstrated that this protein plays an important role during the RNA replication process since only empty, single-shelled particles were assembled at the nonpermissive temperature, suggesting that VP3 might have another function besides adding the cap structure to mRNAs. Additionally, Mansell and Patton (17) used a temperature-sensitive mutant with a lesion in VP6 to gain insight into the role of this protein in the replication of the virus. They found that at the nonpermissive temperature the mutant virus decreased its transcription rate by 20-fold, but the replication of the viral genome only decreased 2-fold; the investigators thus concluded that VP6 was required for the transcriptional activity but that it was not needed for the replicase activity of the DLPs.

In this work we found that even though the synthesis of viral mRNA was severely inhibited when VP1, VP2, VP3, or VP6 was silenced, the synthesis of viral proteins was differentially affected. When VP1 or VP3 was knocked down, the level of viral proteins synthesized was not affected. In fact, when VP1 was silenced, there was an increase of about 30% in the synthesis of viral protein. These results suggest that only a small proportion of the mRNA produced in the infected cell is sufficient to maintain the translation of viral proteins at maximum levels since we found that the same amount of protein was produced when there was 10 times less mRNA (when VP1 or VP3 was knocked down) compared to control, infected cells. One possible explanation of these observations is that the cell translation machinery is already saturated with the viral mRNAs produced at early hours postinfection.

In a recent work, the expression of VP1 from the simian rotavirus strain SA11-5N was silenced by RNA interference

(36). In that work, the effect observed when VP1 was silenced was different from our findings. The main difference is that while in our hands the synthesis of viral protein was not altered when VP1 was knocked down, in the work by Silvestri et al. there was a reduction in the overall protein synthesis. These differences might be the result of the different rotavirus strains used. Alternatively, the differences observed might be due to a differential silencing efficiency of the siRNAs used. We have found that there are variable effects between different siRNAs directed to the same viral protein (16) such that some siRNAs are less potent in silencing the expression of a given protein.

In contrast to the results obtained when VP1 or VP3 were silenced, in the absence of VP2 or VP6 or in the presence of small amounts of these proteins, the translation of viral mRNAs was severely decreased. If the mRNA produced by the entering particles is enough to produce the same level of viral proteins observed in a normal infection, why is viral translation decreased when VP2 or VP6 is knocked down? It has been reported that the simplest RI consists of the viral mRNA associated to VP1 and VP3 (8, 25), which was proposed as the first step in the assembly of the replicative particle. VP2 then becomes associated with this RI, forming the core particle competent in replication, and finally VP6 is added to the core to form DLPs, which are competent to initiate the second round of transcription. Our results could possibly indicate that early in the infection the newly synthesized VP1 and VP3 bind to most of the available mRNA to form RIs so that the positive-sense RNA can be used as a template for the synthesis of the genomic dsRNA. When either of these two proteins is silenced, the mRNA might not be sequestered to form RIs, and then it could be available for translation, whereas when VP2 or VP6 is silenced, most of the mRNA produced by the entering viral particle is sequestered by VP1 and VP3 and cannot be translated. To test this hypothesis, we silenced either VP1 and VP2 or VP1 and VP6 at the same time and quantified the production of viral proteins. Cosilencing of VP1 and VP6 partially restored the synthesis of viral proteins, suggesting that at least part of the inhibition of protein synthesis when VP6 is silenced could be due to the interaction of VP1 with the viral mRNAs. The fact that viral mRNA translation was only partially restored when VP1 and VP6 were cosilenced suggests that VP6 might have another function that could be relevant during the translation of the viral proteins.

While it was expected that in the absence of VP1, the viral RdRp, the transcription and replication of the viral RNAs were going to be strongly inhibited, the observation of the same phenotype when VP3 was silenced was completely unexpected, given its reported activity as the guanylyl- and methyltransferase. Why does the capping enzyme of the virus prevent the transcription and replication of the genome? One possibility is that when VP3 is knocked down, the assembly of viral particles cannot take place, and thus replication is blocked. To test this possibility, the assembly of viral particles under conditions where VP1 or VP3 was silenced was determined. The finding that in the absence of either of these proteins the formation of DLPs and TLPs was decreased was not surprising, given the lack of replication of the viral RNA observed; however, it was interesting to find that the amounts of lower-density particles formed were very similar in the control infected cells and in cells where VP1 or VP3 was silenced. The

presence of these less-dense particles, often referred as to empty particles, is frequently observed during virus purification; their protein content is very similar to that of TLPs and DLPs although on some occasions NSP2 and NSP5 have been found to be associated to them; thus, they might represent a mix of RIs and spontaneously assembled empty viral particles. The finding that these particles are associated with positive-strand viral RNA suggests that at least some of them represent true RIs. From the results obtained here, it was not possible to ascertain whether the detected plus-sense RNA was packaged inside the viral capsid or whether it was only associated to the capsid in a different form. The observation that these types of particles can be formed when either VP1 or VP3 is knocked down suggests that their assembly can proceed in the absence of either protein. These results are in agreement with those reported by Vasquez et al. (39). Taken together, these results suggest that the decrease in viral replication observed when VP3 was silenced is most probably due to an RNA replication defect rather than to an assembly problem, and they suggest that VP3 may have a novel and thus far undetermined role during *in vivo* replication of the virus.

In contrast, when VP2 and VP1 were cosilenced, the translation of the viral proteins was not restored, suggesting that VP2 could have a role in the metabolism of viral RNA in addition to being required for the replication of the genome. To explore the direct or indirect participation of VP2 in the stability of the viral RNAs, the half-life of a reporter viral mRNA was determined in infected cells in which VP2 was silenced (Fig. 9A). The decrease in the half-life observed (9 h) under these conditions does not seem to explain the severe decrease in protein translation attained. Thus, to determine if in the absence of VP2 there was a change in the cellular distribution of the viral mRNA that could contribute to the decreased viral mRNA translation, we utilized FISH to localize the distribution of viral mRNA in infected cells. As expected, the distributions of gene 10 (Fig. 9B) and gene 6 (data not shown) mRNAs were cytoplasmic with a strong perinuclear signal, close to viroplasm, which corresponds to the sites where the mRNA is produced (35). The same distribution of the mRNA was found when VP1 was silenced although a slight decrease in the fluorescent signal was observed. In contrast, when VP2 was silenced, there was a weak hybridization signal throughout the cell's cytoplasm, showing that little viral mRNA was present in the cells. These results suggest that in the absence of VP2 either there is a severe degradation of the viral mRNA or the transcriptional activity of the entering particles is blocked; this latter possibility seems less likely.

Silvestri et al. (35) characterized the cellular distribution of a bromodeoxyuridine-labeled rotavirus mRNA that was transfected into rotavirus-infected MA104 cells and found that at 9 hpi the labeled RNA collected into punctuate centers that did not colocalize with viroplasms. In this work we used a different strategy to visualize the viral RNA. In our case we infected MA104 cells, and the endogenously transcribed viral RNA (genes 10 or 6) was visualized by hybridization using a DIG-labeled probe complementary to a region of the mRNAs. The differences in the patterns observed by us and by Silvestri et al. may be due to the amount of RNA that can be transfected, in contrast to the amount of viral RNA that accumulates at 6 hpi. We think that either the viral mRNA, after been synthesized in

the viroplasms, diffuses to the cytoplasm or that a protein (viral or cellular) actively pulls out the mRNAs committed for translation.

Silencing the expression of the viral proteins in the context of an infected cell allows us to learn about the roles of each individual protein during the replicative cycle of rotavirus. We have found that some viral proteins are somehow involved in regulating the translation of the viral mRNAs or their half-lives. For instance, VP2 seems to be important for the stability of the viral mRNAs while VP6 might have a role in the translation of viral proteins. It is also clear that there are many protein-protein and protein-RNA interactions that take place during this process that make the interpretation of the knocked-down phenotypes not straightforward. Nevertheless, the characterization of these phenotypes in conjunction with the previous findings with rotavirus variants, and hopefully with the reverse genetic system recently developed (13), will help us to unravel the details of the replicative cycle of this virus and its interactions with the host cell.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Mery Piña for the sequence of RRV gene 3 and to Paul Gaytan and Eugenio Lopez for their support with the synthesis of oligonucleotides.

This work was supported by grants 55005515 from the Howard Hughes Medical Institute, IN212288 from DGAPA-UNAM, and 60025 from CONACyT. C.A.-B. is a recipient of a scholarship from CONACyT.

#### REFERENCES

- Campagna, M., C. Eichwald, F. Vascotto, and O. R. Burrone. 2005. RNA interference of rotavirus segment 11 mRNA reveals the essential role of NSP5 in the virus replicative cycle. *J. Gen. Virol.* **86**:1481–1487.
- Chen, D., C. Q. Zeng, M. J. Wentz, M. Gorziglia, M. K. Estes, and R. F. Ramig. 1994. Template-dependent, *in vitro* replication of rotavirus RNA. *J. Virol.* **68**:7030–7039.
- Dector, M. A., P. Romero, S. Lopez, and C. F. Arias. 2002. Rotavirus gene silencing by small interfering RNAs. *EMBO Rep.* **3**:1175–1180.
- Estes, M. A., K. A. 2007. Rotaviruses, p. 1917–1974. *In* D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, and S. E. Straus (ed.), *Fields virology*, 5th ed., vol. 2. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
- Fabbretti, E., I. Afrikanova, F. Vascotto, and O. R. Burrone. 1999. Two non-structural rotavirus proteins, NSP2 and NSP5, form viroplasm-like structures *in vivo*. *J. Gen. Virol.* **80**:333–339.
- Fan, X., E. Roy, L. Zhu, T. C. Murphy, M. Kozlowski, M. S. Nanes, and J. Rubin. 2003. Nitric oxide donors inhibit luciferase expression in a promoter-independent fashion. *J. Biol. Chem.* **278**:10232–10238.
- Fenaux, M., M. A. Cuadras, N. Feng, M. Jaimes, and H. B. Greenberg. 2006. Extraintestinal spread and replication of a homologous EC rotavirus strain and a heterologous rhesus rotavirus in BALB/c mice. *J. Virol.* **80**:5219–5232.
- Gallegos, C. O., and J. T. Patton. 1989. Characterization of rotavirus replication intermediates: a model for the assembly of single-shelled particles. *Virology* **172**:616–627.
- Gonzalez, R. A., M. A. Torres-Vega, S. Lopez, and C. F. Arias. 1998. *In vivo* interactions among rotavirus nonstructural proteins. *Arch. Virol.* **143**:981–996.
- Guerrero, C. A., S. Zarate, G. Corkidi, S. Lopez, and C. F. Arias. 2000. Biochemical characterization of rotavirus receptors in MA104 cells. *J. Virol.* **74**:9362–9371.
- Imai, M., K. Akatani, N. Ikegami, and Y. Furuichi. 1983. Capped and conserved terminal structures in human rotavirus genome double-stranded RNA segments. *J. Virol.* **47**:125–136.
- Johnson, M. A., and M. A. McCrae. 1989. Molecular biology of rotaviruses. VIII. Quantitative analysis of regulation of gene expression during virus replication. *J. Virol.* **63**:2048–2055.
- Komoto, S., J. Sasaki, and K. Taniguchi. 2006. Reverse genetics system for introduction of site-specific mutations into the double-stranded RNA genome of infectious rotavirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**:4646–4651.
- Lawton, J. A., M. K. Estes, and B. V. Prasad. 1997. Three-dimensional visualization of mRNA release from actively transcribing rotavirus particles. *Nat. Struct. Biol.* **4**:118–121.
- Livak, K. J., and T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression

- data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* **25**:402–408.
16. **Lopez, T., M. Rojas, C. Ayala-Breton, S. Lopez, and C. F. Arias.** 2005. Reduced expression of the rotavirus NSP5 gene has a pleiotropic effect on virus replication. *J. Gen. Virol.* **86**:1609–1617.
  17. **Mansell, E. A., and J. T. Patton.** 1990. Rotavirus RNA replication: VP2, but not VP6, is necessary for viral replicase activity. *J. Virol.* **64**:4988–4996.
  18. **Mingle, L. A., N. N. Okuhama, J. Shi, R. H. Singer, J. Condeelis, and G. Liu.** 2005. Localization of all seven messenger RNAs for the actin-polymerization nucleator Arp2/3 complex in the protrusions of fibroblasts. *J. Cell Sci.* **118**:2425–2433.
  19. **Montero, H., C. F. Arias, and S. Lopez.** 2006. Rotavirus nonstructural protein NSP3 is not required for viral protein synthesis. *J. Virol.* **80**:9031–9038.
  20. **Montero, H., M. Rojas, C. F. Arias, and S. Lopez.** 2008. Rotavirus infection induces the phosphorylation of eIF2 $\alpha$  but prevents the formation of stress granules. *J. Virol.* **82**:1496–1504.
  21. **Padilla-Noriega, L., R. Werner-Eckert, E. R. Mackow, M. Gorziglia, G. Larralde, K. Taniguchi, and H. B. Greenberg.** 1993. Serologic analysis of human rotavirus serotypes P1A and P2 by using monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.* **31**:622–628.
  22. **Pando, V., P. Isa, C. F. Arias, and S. Lopez.** 2002. Influence of calcium on the early steps of rotavirus infection. *Virology* **295**:190–200.
  23. **Parashar, U. D., E. G. Hummelman, J. S. Bresee, M. A. Miller, and R. I. Glass.** 2003. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg. Infect. Dis.* **9**:565–572.
  24. **Patton, J. T.** 1990. Evidence for equimolar synthesis of double-strand RNA and minus-strand RNA in rotavirus-infected cells. *Virus Res.* **17**:199–208.
  25. **Patton, J. T.** 2001. Rotavirus RNA replication and gene expression. *Novartis Found. Symp.* **238**:64–81.
  26. **Patton, J. T.** 1996. Rotavirus VP1 alone specifically binds to the 3' end of viral mRNA, but the interaction is not sufficient to initiate minus-strand synthesis. *J. Virol.* **70**:7940–7947.
  27. **Patton, J. T., and D. Chen.** 1999. RNA-binding and capping activities of proteins in rotavirus open cores. *J. Virol.* **73**:1382–1391.
  28. **Patton, J. T., and C. O. Gallegos.** 1990. Rotavirus RNA replication: single-stranded RNA extends from the replicase particle. *J. Gen. Virol.* **71**:1087–1094.
  29. **Patton, J. T., M. T. Jones, A. N. Kalbach, Y. W. He, and J. Xiaobo.** 1997. Rotavirus RNA polymerase requires the core shell protein to synthesize the double-stranded RNA genome. *J. Virol.* **71**:9618–9626.
  30. **Patton, J. T., and E. Spencer.** 2000. Genome replication and packaging of segmented double-stranded RNA viruses. *Virology* **277**:217–225.
  31. **Persengiev, S. P., X. Zhu, and M. R. Green.** 2004. Nonspecific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs). *RNA* **10**:12–18.
  32. **Pesavento, J. B., S. E. Crawford, M. K. Estes, and B. V. Prasad.** 2006. Rotavirus proteins: structure and assembly. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **309**:189–219.
  33. **Prasad, B. V., G. J. Wang, J. P. Clerx, and W. Chiu.** 1988. Three-dimensional structure of rotavirus. *J. Mol. Biol.* **199**:269–275.
  34. **Schwarz, B. A., R. Bange, T. W. Vahlenkamp, R. Johne, and H. Muller.** 2002. Detection and quantitation of group A rotaviruses by competitive and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* **105**:277–285.
  35. **Silvestri, L. S., Z. F. Taraporewala, and J. T. Patton.** 2004. Rotavirus replication: plus-sense templates for double-stranded RNA synthesis are made in viroplasm. *J. Virol.* **78**:7763–7774.
  36. **Silvestri, L. S., M. A. Tortorici, R. Vasquez-Del Carpio, and J. T. Patton.** 2005. Rotavirus glycoprotein NSP4 is a modulator of viral transcription in the infected cell. *J. Virol.* **79**:15165–15174.
  37. **Sledz, C. A., M. Holko, M. J. de Veer, R. H. Silverman, and B. R. Williams.** 2003. Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat. Cell Biol.* **5**:834–839.
  38. **Stacy-Phipps, S., and J. T. Patton.** 1987. Synthesis of plus- and minus-strand RNA in rotavirus-infected cells. *J. Virol.* **61**:3479–3484.
  39. **Vásquez, M., A. M. Sandino, J. M. Pizarro, J. Fernandez, S. Valenzuela, and E. Spencer.** 1993. Function of rotavirus VP3 polypeptide in viral morphogenesis. *J. Gen. Virol.* **74**:937–941.