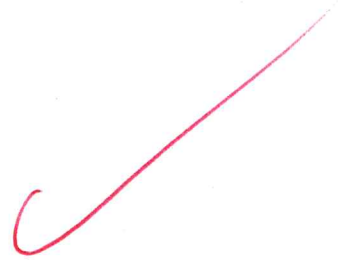


UCH-FC  
DOC-B  
B277  
C.1



**“Función de la estructura secundaria del RNA  
mensajero en la replicación del genoma del rotavirus.”**

Tesis

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Doctor en Ciencias con mención en Biología

Facultad de Ciencias

por

Mario Liván Barro Alvarez

Agosto, 2002

Director de Tesis: Dr. Eugenio Spencer Ossa



**FACULTAD DE CIENCIAS**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**INFORME DE APROBACIÓN**

**TESIS DE DOCTORADO**

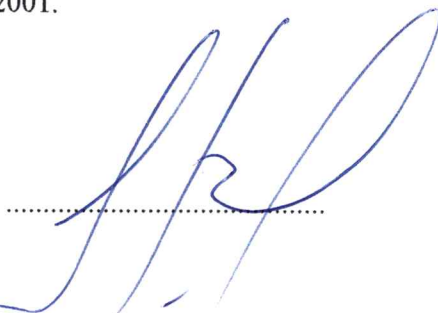
Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

**MARIO LIVAN BARRO ALVAREZ**

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 22 de marzo de 2001.

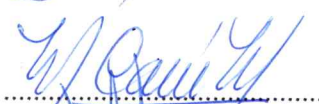
Director de Tesis:

Dr Eugenio Spencer Ossa

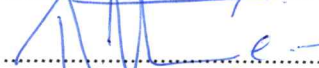


Comisión de Evaluación de Tesis:

Dra. Margarita Carú



Dr Romilio Espejo



Dr. Oscar León



*... todo es hermoso y constante  
todo es música y razón,  
y todo como el diamante  
antes que luz es carbón...*  
José Martí

**“....a mi amada esposa Suany..  
porque fuiste roble cuando yo fui menos  
y fuiste pluma cuando endurecí”**

## AGRADECIMIENTOS.

- Al Dr. Eugenio Spencer por la extraordinaria claridad científica con que dirigió este trabajo. La mano que evitó los errores e impulsó el camino. Por la ciencia.
- A Eugenio, porque me abrió las puertas de su laboratorio sin apenas conocerme, dándome una oportunidad de vida y haciendo un sueño realidad. Porque compartimos juntos buenos y malos momentos y porque los buenos fueron muchos más. Por la amistad.
- A Suany por las noches de desvelo a mi lado y el apoyo de siempre. Por la felicidad que le pusiste a mis éxitos y la fuerza que me diste para sortear los fracasos. Por el amor.
- Al Guillo y al Rubio porque les debo la libertad y sin eso no estaría escribiendo ni una línea de estos agradecimientos. Por la amistad
- A la otra parte de la diáspora, al Conde, a PF y al Manolo porque cada uno de ellos me demostró que se podía. Por la amistad.
- A mi amigo Jonas por ese café del primer día. Porque siempre decimos lo que pensamos aunque a veces no pensamos lo que decimos. Por la amistad.
- Al servicio de cooperación alemán (DAAD). Porque sin su apoyo financiero no hubiera sido posible abordar este doctorado. Por la oportunidad que le a dado a tanta gente linda en Latinoamérica. GRACIAS.
- A todos los profesores del Doctorado de Biología de la Facultad de Ciencias. Porque cada uno a su manera apporto en mi formación y me ayudo a crecer. A la Dra. Rosalba Lagos por su magisterio casi sagrado. Al Dr. Romilio Espejo por la pregunta incisiva, el comentario justo y la vista larga. A la Dra Margarita Carú por la exquisita revisión de esta tesis. Por la ciencia.
- A los profesores y colaboradores de la universidad de Santiago. Al Dr. Claudio Vázquez por su apoyo y su amistad. A la Dra Ana Maria Sandino por ayudarme a balancear díscolas hipótesis y convertirlas en objetivos claros. A la Dra



Alejandra Moenne por la Mauriceville y sus comentarios. Por la ciencia y la amistad.

- Un agradecimiento muy especial a los Drs. John T. Patton y Dayue Chen del Instituto Nacional de Salud Pública de los Estados Unidos. Ambos apoyaron esta tesis más que con palabras con hechos. Por la ciencia.
- A todos los amigos con los que compartí laboratorio durante estos 4 años. A las brujas porque sin ustedes no es posible aunque con ustedes sea difícil también. A la Tere porque es bastión y amiga. A Paola porque me ayudo a dar los primeros pasos de esta tesis. A la Claudita porque compartió el final. Por la amistad
- Aparte esta “el club de Tobi”. Léase, todos los machos masculinos, hembros, varones del laboratorio. Con ellos formamos una cofradía única que compartió buenos momentos y ..... cervezas. Al Pepe, al Pichón, al Andres, al Jonas, a William y luego a Manchego (te perdono la lentitud compadre!), al Rodrigo y al Jaimito. Por la amistad.
- A Oscarito porque dejas las cosas listas para que la tropa funcione. Por la amistad.
- A los compañeros del doctorado. Gente de verdad, auténticos cada uno. Al Gino, a la Paty, el Page, la Mayte, el Jose Antonio (esos laboratorios de Bioquímica!), la Claudia y la Raquel. Por la amistad.
- A mis padres que aunque lejos no dejaron de alentarme y confiaron en mí a pesar que no tenían ni idea del lío en que se había metido su hijo. Por la vida y el amor.
- Aunque suene exagerado ....a Chile porque allí me sentí como en casa y encontré gente maravillosa ...eso siempre me dio fuerzas. Viva Chile!

## ÍNDICE DE MATERIAS.

	Pag.
ABREVIATURAS	I
RESUMEN	II
SUMMARY	V
INTRODUCCIÓN	1
1 Generalidades.	1
2 Estructura del virus. Partículas y subpartículas virales.	1
3 Ciclo infectivo.	5
3.1 Entrada del virus a la célula.	5
3.2 Síntesis de RNAs virales.	5
4 Sistema in vitro de transcripción de Rotavirus.	8
5 Sistema in vitro de replicación de Rotavirus.	8
6 Antecedentes de presente trabajo.	11
MATERIALES Y MÉTODOS.	18
1 Reactivos.	18

<b>2</b>	<b>Soluciones.</b>	<b>18</b>
<b>3</b>	<b>Material Biológico.</b>	<b>19</b>
<b>4</b>	<b>Cultivo de Células MA-104.</b>	<b>19</b>
<b>5</b>	<b>Infección y propagación de cepas virales de rotavirus.</b>	<b>20</b>
<b>6a</b>	<b>Purificación de partículas de simple cubierta (single shelled).</b>	<b>20</b>
<b>6b</b>	<b>Obtención de “open cores”.</b>	<b>22</b>
<b>7</b>	<b>Síntesis “<i>in vitro</i>” y purificación de mRNAs totales de rotavirus.</b>	<b>23</b>
<b>8</b>	<b>Ensayo de replicación “<i>in vitro</i>”.</b>	<b>24</b>
<b>9</b>	<b>Purificación de dsRNA genómico de rotavirus.</b>	<b>25</b>
<b>10</b>	<b>Electroforesis y tinción de RNAs.</b>	<b>26</b>
<b>11</b>	<b>Análisis cuantitativo de emisiones.</b>	<b>26</b>
	<b>RESULTADOS</b>	<b>28</b>
<b>1</b>	<b>Estudio de la capacidad de los “open cores” de utilizar un molde de dsRNA genómico.</b>	<b>28</b>
<b>2</b>	<b>Comparación del uso del mRNA exógeno versus el dsRNA endógeno por los “open cores”.</b>	<b>32</b>
<b>3</b>	<b>Estudio de la replicación de la hebra negativa del gen 5 en el contexto de la síntesis de los 11 dsRNA.</b>	<b>36</b>

<b>4</b>	<b>Efecto del uso de oligonucleótidos G5 3'-C21 mutados sobre la síntesis de la hebra negativa del gen 5 de la cepa SA11-4F.</b>	<b>39</b>
<b>5</b>	<b>Análisis de la región formada por las últimas 21 bases del extremo 3' del gen 5 de la cepa SA11-4F en la síntesis de la hebra negativa de este gen.</b>	<b>42</b>
<b>6</b>	<b>Búsqueda en el extremo 3' del mRNA del gen 5 de otras zonas importantes para la síntesis de la hebra negativa.</b>	<b>45</b>
<b>7</b>	<b>Búsqueda de fragmentos abortivos de replicación durante la inhibición de síntesis de hebra negativa mediada por oligonucleótidos dirigidos contra el extremo 3' del gen 5.</b>	<b>49</b>
<b>8</b>	<b>Análisis de las secuencias y estructuras de los extremos 3' de los mRNAs de Rotavirus.</b>	<b>51</b>
<b>9</b>	<b>Estudio del efecto sobre la síntesis de la hebra negativa de oligonucleótidos antisentidos dirigidos contra la región de posible estructura de tallo y horquilla del gen 5 de la cepa SA11-4F.</b>	<b>56</b>
<b>10</b>	<b>Efecto del tRNA sobre la replicación endógena y sobre la síntesis de hebra negativa utilizando a los 11 mRNAs virales como molde.</b>	<b>59</b>
<b>11</b>	<b>Efecto de la adición de tRNA de levadura sobre el uso de dsRNA exógeno por los "open cores" virales.</b>	<b>62</b>
<b>12</b>	<b>Estudio del efecto de la estructura secundaria del tRNA sobre el uso del dsRNA como molde para la replicación.</b>	<b>64</b>
<b>13</b>	<b>Efecto del Mauriceville RNA (MNH) sobre el uso del dsRNA como molde para la replicación.</b>	<b>66</b>
<b>14</b>	<b>Estudio de la adición de un dsRNA heterólogo sobre la replicación endógena de los "open cores".</b>	<b>68</b>

<b>15 Efecto de oligonucleótidos dirigidos contra el extremo 3' del gen 5 sobre la replicación endógena.</b>	<b>70</b>
<b>16 Estudio del papel del extremo 5' del gen 5 de la cepa SA11-4F sobre la síntesis de su hebra negativa.</b>	<b>72</b>
<b>DISCUSIÓN.</b>	<b>76</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>88</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>89</b>

## LISTA DE TABLAS.

	Pag.
1.       Secuencias de los oligonucleótidos antisentidos dirigidos contra las últimas 21 bases del extremo 3'-del gen 5 que presentan cambios de dos bases respecto a G5 3'-C21.	41
2.       Secuencia de los oligonucleótidos antisentidos de diferente número de bases dirigidos contra las últimas 21 bases del extremo 3'- del gen 5 de la cepa SA11-4F.	44
3.       Secuencia de los oligonucleótidos antisentidos desplazados unos respecto a otros en tres bases en dirección al 5' del gen 5 de la cepa SA11-4F.	47
4.       Secuencia de los oligonucleótidos antisentidos dirigidos contra diferentes regiones del extremo 5' de la cepa SA11-4.	75

## LISTA DE FIGURAS.

	Pag.
1. Principales características de la cepa prototipo SA11.	2
2. Organización de las proteínas y del genoma de dsRNA en las partículas de Rotavirus.	4
3. Principales eventos durante el ciclo infeccioso de Rotavirus.	10
4. Uso de oligonucleótidos antisentidos para determinar la importancia del 3' del mRNA en el reconocimiento específico y en la síntesis de la hebra negativa del dsRNA genómico de Rotavirus.	18
5. Uso de dsRNA genómico de Rotavirus como molde por los "open cores".	30
6. Cuantificación del producto relativo de los genes 5 y 10 de las cepas SA11-4F y DxRRV en ensayos donde el uso de un dsRNA genómico exógeno es evaluada vs el endógeno.	31
7. Uso preferencial del mRNA total de la cepa DxRRV como molde por "open cores" de SA11-4F con replicación endógena residual.	34
8. Cuantificación del producto relativo del gen 5 de las cepas SA11-4F y DxRRV, mostrando el uso preferencial del mRNA del DxRRV sobre el dsRNA endógeno.	35
9. Efecto de un oligonucleótido antisentido dirigido contra las últimas 21 bases del extremo 3'- del gen 5 de la cepa SA11-4F sobre la síntesis de la hebra negativa de las cepas SA11-4F y DxRRV.	38

10.	<b>Efecto de oligonucleótidos antisentidos dirigidos contra las últimas 21 bases del extremo 3'- del gen 5 sobre la síntesis de la hebra negativa de la cepa SA11-4F.</b>	40
11.	<b>Efecto de oligonucleótidos antisentidos antisentido de diferente número de bases dirigidos contra las últimas 21 bases del extremo 3'- del gen 5 sobre la síntesis de la hebra negativa de la cepa SA11-4F.</b>	43
12.	<b>Efecto de oligonucleótidos antisentidos desplazados unos respecto a otros en tres bases en dirección al 5' del gen 5 sobre la síntesis de la hebra negativa de las cepas SA11-4F y DxRRV.</b>	47
13.	<b>Ausencia de productos abortivos de síntesis de hebra negativa ante la inhibición provocada por oligos dirigidos contra el extremo 3' del mRNA.</b>	50
14.	<b>Alineamiento de las secuencias de las últimas 75 bases de 6 diferentes mRNAs de la cepa SA11-4F. Modelo de la estructura secundaria del extremo 3' del gen 5.</b>	54
15.	<b>Análisis de las secuencias y estructuras secundarias de los extremos 3' de los mRNAs de Rotavirus.</b>	55
16.	<b>Oligonucleótidos antisentidos dirigidos contra las regiones entre las bases 28-40 y 35-47 afectan la síntesis de la hebra negativa del gen 5 de la cepa SA11-4F.</b>	57
17.	<b>Oligonucleótidos antisentidos dirigidos contra las regiones entre las bases 28-40 y 35-47 afectan la síntesis de la hebra negativa del gen 5 de la cepa SA11-4F.</b>	58
18.	<b>Efecto del tRNA sobre la replicación endógena y sobre la síntesis de hebra negativa utilizando al mRNA como molde.</b>	60



19.	<b>Cuantificación del producto relativo del gen 5 del producto de la replicación endógena de los "open cores" de la cepas SA11-4F y de la síntesis la hebra negativa del mRNA del gen 5 de la misma cepa en presencia de diferentes cantidades de tRNA.</b>	61
20.	<b>Efecto de la adición de tRNA de levadura sobre el uso de dsRNA exógeno por los "open cores" virales.</b>	63
21.	<b>La estructura secundaria del tRNA es responsable de su efecto inhibitorio sobre el uso del dsRNA como molde para la replicación.</b>	65
22.	<b>El Mauriceville RNA tiene un efecto inhibitorio similar al tRNA sobre el uso del dsRNA como molde para la replicación.</b>	67
23.	<b>El dsRNA del Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa no afecta la replicación endógena y tampoco es utilizado como molde por los "open cores".</b>	69
24.	<b>Los oligonucleótidos G5 3'-C21 y 21-8 no inhiben específicamente la replicación endógena del gen 5.</b>	71
25.	<b>La región entre los nucleótidos 15-35 del extremo 5' del gen 5 de la cepa SA11-4F contiene señales importantes en la síntesis de la hebra negativa complementaria al mRNA de este gen.</b>	74

## ABREVIATURAS.

RNA	: ácido ribonucleico
dsRNA	: RNA de doble hebra.
mRNA	: RNA mensajero
tRNA	: RNA de transferencia
RPR	:RNA polimerasa RNA dependiente
UTR	: regiones no traducibles
IRES	: regiones internas de unión de los ribosomas
IPNV	: Virus de la necrosis pancreática infecciosa
EDTA	: Ácido etilendiaminotetraacético.
MEM	: Medio mínimo de EAGLE.
M.O.I.	: Multiplicidad de infección.
PAGE	: Electroforesis en gel de poliacrilamida.
SDS	: Dodecil sulfato de sodio.
SFB	: Suero fetal bovino.
u.f.p./cél.	: Unidades formadoras de placas por célula.

## RESUMEN.

El Rotavirus es el principal agente viral asociado a enfermedades diarreicas en humanos. Este virus sin membrana pertenece a la familia *Reoviridae* y presenta una estructura icosaédrica compuesta por tres capas proteicas que contienen un genoma formado por 11 segmentos monocistrónicos de RNA de doble hebra. El ciclo infectivo del virus ocurre en el citoplasma y durante el mismo los mRNAs son utilizados como moldes para producir los dsRNAs genómicos. Este proceso de síntesis de la hebra negativa, ocurre simultáneamente con el ordenamiento y empaquetamiento de los 11 diferentes genes virales.

No ha sido posible aún establecer un sistema de genética reversa que permita introducir en una partícula infectiva ácidos nucleicos previamente manipulados. Un gran paso de avance en el estudio de las señales involucradas en la replicación del rotavirus ha sido el desarrollo por Chen y cols. de un sistema *in vitro* compuesto por cores virales abiertos mediante un shock hipotónico. Estos cores abiertos también conocidos como "open cores" son capaces de utilizar el mRNA viral como molde para la síntesis de la hebra negativa del dsRNA genómico.

El uso de los "open cores" combinados a RNAs quiméricos ha demostrado la existencia de tres regiones que contienen información importante para la síntesis de la cadena negativa durante la replicación del genoma viral: (i) el extremo 5'- de la región no traducida (UTR), (ii) la secuencia del 3'- UTR que se encuentran río arriba a la secuencia consenso del extremo 3'-, (iii) la propia secuencia consenso del extremo 3'-.

La secuencia consenso del extremo 3'- es esencial para que ocurra el evento de síntesis de hebra negativa.

Una característica importante de los "open cores" es su capacidad de utilizar el dsRNA genómico empaquetado dentro de ellos como molde de replicación. Este hecho apunta a que el sistema es capaz de utilizar dos moldes diferentes que podrían estar mostrando diferentes señales y que durante el momento del empaquetamiento del virus cohabitan en el viroplasma.

En esta tesis hemos profundizado en el estudio de las señales involucradas en los procesos de síntesis de la hebra negativa del genoma viral y en el uso del dsRNA como molde por los "open cores". Algunas nuevas estrategias han sido utilizadas para el cumplimiento de estos objetivos. El uso de oligonucleótidos antisentido permitió estudiar con más detalle las señales generales y específicas involucradas en la síntesis de la hebra negativa del genoma de rotavirus. En este estudio se demostró que los "open cores" son capaces de reconocer al dsRNA genómico exógeno como molde independientemente de la cepa de origen, indicando además que el complejo VP1-VP2-VP3 reconoce señales generales en los dsRNAs genómicos sin que medie la participación de VP6 en este proceso. Estas señales de reconocimiento son diferentes a las que participan en el uso del mRNA viral como molde en la síntesis de la hebra negativa. En ensayos donde los "open cores" podían usar tanto mRNA virales como dsRNA genómico, se demostró que existe una preferencia por el uso del mRNA como molde. Esta propiedad permite que el mRNA viral de una cepa pueda ser usado por "open cores" de otra cepa desplazando al dsRNA original de la cepa nativa. La señal es común entre los mRNAs de diferentes cepas, pues todos los mRNAs producen un desplazamiento similar en el uso del dsRNA endógeno.

Basado en un análisis estructural combinado con el uso de diferentes RNAs con estructura secundaria conocida y con la utilización de oligonucleótidos antisentidos, hemos podido sugerir la existencia de una señal de común para el extremo 3' de todos los mRNAs de rotavirus. Las señales comunes entre los mRNAs de rotavirus para la síntesis de la hebra negativa son el extremo CCA del 3' con al menos 9 bases en forma de simple hebra y una estructura secundaria de tipo tallo y horquilla en la región río arriba a la secuencia consenso del 3' UTR. El reconocimiento de este tipo de estructura es el responsable del desplazamiento del dsRNA como molde por los mRNAs virales en la replicación. Esta estructura secundaria esta conservada entre genes iguales de diferentes cepas independientemente de los cambios de secuencia observados entre estos genes, lo que apoya el papel funcional de la misma.

Utilizando oligos antisentidos también hemos obtenidos resultados que sugieren que la inhibición de la síntesis de hebra negativa es específica para el gen contra el cual están dirigidos. Esta especificidad podría estar relacionada con el proceso de ordenamiento de los 11 segmentos virales durante la formación de la partícula viral, evitándose así la incorporación repetida de un segmento dentro del virión. También a través del uso de estos oligos pudimos determinar que el extremo 5' UTR del mRNA viral también es requerido para la síntesis de la hebra negativa. La inhibición observada demuestra que el 5'- participa en la síntesis de la hebra negativa, requiriéndose libre al menos 20 bases de este extremo.

## SUMMARY.

Rotavirus open cores could catalyze the synthesis of viral mRNA and double-stranded (ds)RNA. As template it can use the double-stranded endogenous RNA (dsRNA) or single stranded exogenous viral mRNA. In the present communication the use of different antisense deoxyribo-oligonucleotides complementary to the 3' and/or the 5' ends of viral mRNA were used to define critical sequences for minus strand RNA synthesis. The open cores system showed a preferential use of viral mRNAs over genomic dsRNAs, suggesting that VP1 in the open core is not tightly bound to the viral genome. The use of deoxyribo-oligonucleotides complementary to the 3' end of gene 5 shown that it contains individual specific signals recognized by the replicative machinery. These signals are located in the last 9 nucleotides of the 3' end, and they differ between two homologous genes from different viral strains such SA11-4F and DxRRV. Those strains seem to share similar requirements in the region of nucleotides 15 to 36 of gene 5. The 5' end of the viral mRNA seems also be required since deoxyribo-oligonucleotides complementary to that end are also partially inhibitory. In this case the requirement involves the strandedness of last 20 bases of the 5' end.

The synthesis of the viral genome involves a two-step pathway; the first one is the synthesis of the plus strand that may act either as mRNA or template for minus strand synthesis to complete the viral genome (second step). The open core catalyzed both plus and minus strand synthesis indicating that transcription and minus strand synthesis could be coupled yielding a double stranded product identical to the template. The results shown that the open core is able to recognize signals in the double strand RNA template

that allowed to initiate transcription. However, the mRNA seems to contain different signals because it exhibits a higher affinity for the replication complex. The structural analysis suggests the existence of a stem and loop secondary structure in all 3' end of rotavirus genes. The role of this structure in the minus strand synthesis was addressed by the addition to the open core *in vitro* reaction of antisense oligonucleotides and RNAs with known stem and loop structure. The results shown that there is at least three important signals located in the 3' end of the viral mRNA, which are involved in the synthesis of the Rotavirus genome. The signals are, a conserved CCA end, a strandedness of the last 9 bases, and a conserved stem and loop secondary structure.

# INTRODUCCIÓN.

## 1. - Generalidades.

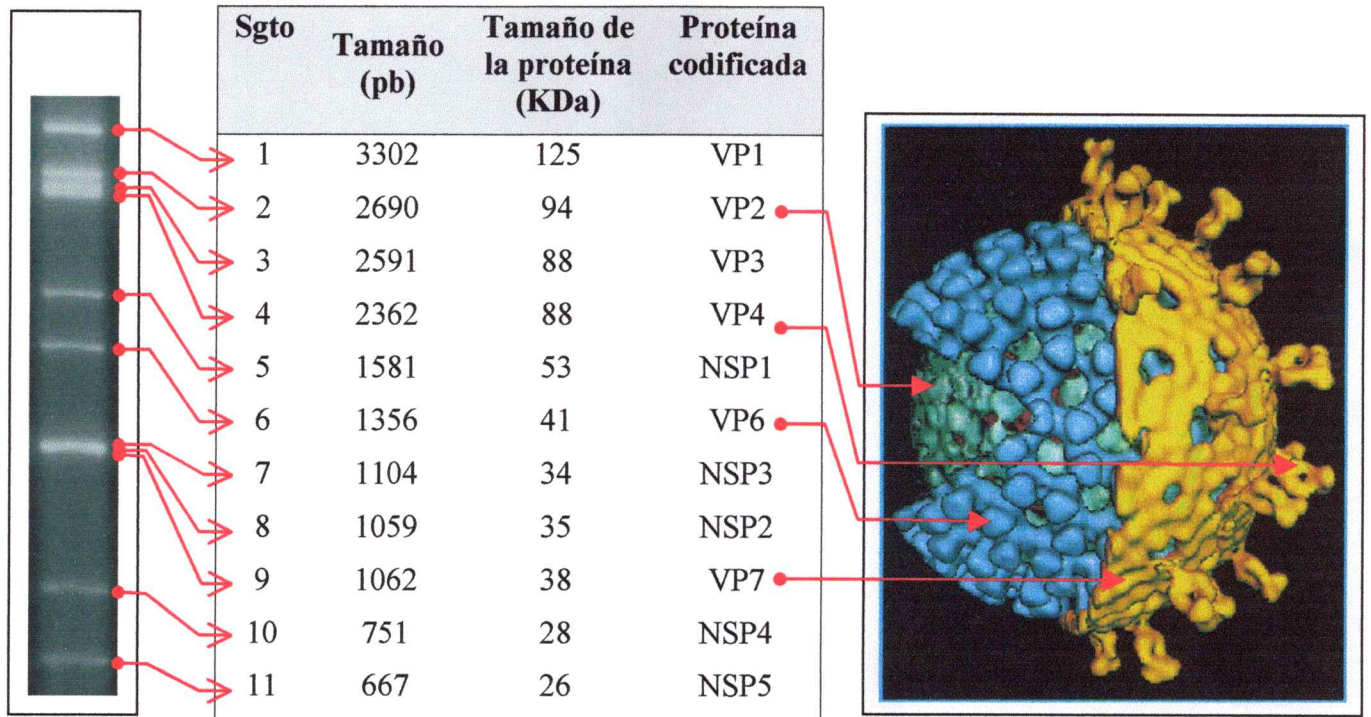
Los virus con un genoma compuesto por ácido ribonucleico de doble hebra son capaces de infectar un amplio espectro de organismos desde vertebrados hasta bacterias. Estos virus pertenecen a tres familias diferentes dentro de la clasificación taxonómica actual, *Reoviridae*, *Birnaviridae* y *Cystoviridae* (Fauquet, 1994). La familia Reoviridae es la más grande e incluye algunos virus bien estudiados como el "bluetonge" (BTV) (Roy, 1996), el ortoreovirus (Nibert y col., 1996) y el rotavirus (Estes, 1996).

El Rotavirus es el principal agente viral asociado a enfermedades diarreicas en humanos. Este virus ocasiona pérdidas económicas por la infección de especies animales de importancia ganadera tales como cerdos, vacunos y aves (Kapikian y Chanock, 1996). En países subdesarrollados la infección por Rotavirus es responsable de grandes cifras de mortalidad infantil y en países del llamado primer mundo continúa generando gastos de millones de dólares en hospitalizaciones de infantes menores de seis meses (Bern y cols., 1992; Arden-Holmes y cols., 1999; Cook y cols., 1990).

## 2.- Estructura del virus. Partículas y subpartículas virales.

El genoma de Rotavirus está compuesto por 11 segmentos de RNA de doble hebra. Cada uno de los segmentos codifica para un solo polipéptido viral, de los cuales seis son estructurales y cinco no estructurales. El tamaño de los mismos varía entre 650 y 3300 pares de bases (figura 1) y todos ellos tienen una estructura de 'cap' en el extremo 5' de la hebra codificante.



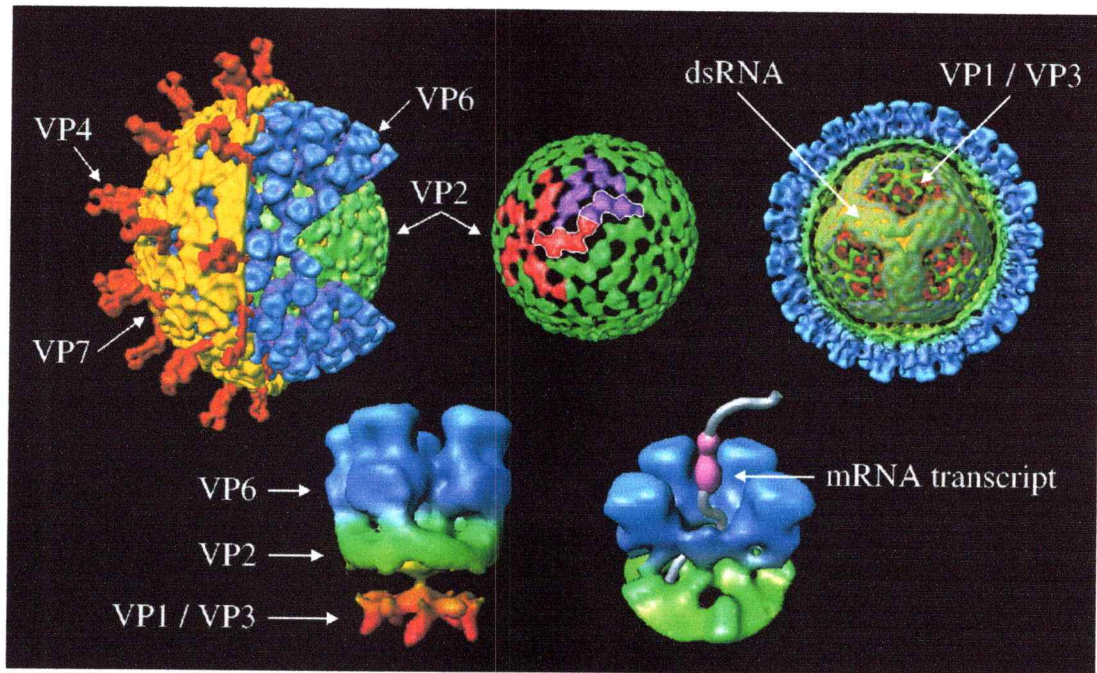


**Figura 1. Principales características de la cepa SA11-4F.**

A la izquierda se muestra la resolución por electroforesis de los segmentos del RNA genómico viral de SA11. La columna que indica peso molecular de proteínas codificadas, se refiere a peso molecular aparente calculado en SDS-PAGE. La figura de la derecha fue tomada de Prasad y cols. (1988).

Los 11 segmentos de dsRNA genómico de Rotavirus pueden ser purificados y separados por electroforesis en geles de poliacrilamida. La visualización de los 11 segmentos puede realizarse mediante una tinción con plata de los mismos. El patrón de migración de los 11 segmentos se denomina *electroferotipo*, el cual es muy variable entre los diversos aislados de campo e incluso entre las cepas de laboratorio

La partícula infectiva está formada por tres cubiertas proteicas concéntricas de geometría icosaédrica. La cubierta externa está formada por 780 moléculas de la glicoproteína VP7 y 120 unidades de VP4 y la misma le confiere capacidad infectiva al virus. La segunda capa proteica está compuesta de 260 trímeros de VP6. El núcleo viral (core) constituye la tercera cubierta proteica la cual contiene las proteínas estructurales VP1, VP2 y VP3. La proteína VP1 es la RNA polimerasa RNA dependiente (RPR) que efectúa los procesos de transcripción y replicación del genoma. Se ha podido determinar que cada segmento de dsRNA está unido a una molécula de RPR, formando una estructura de tirabuzón con ambos extremos unidos a la polimerasa. La proteína VP2 constituye el esqueleto y soporte del 'core' viral y VP3 posee actividad guanilil transferasa por lo cual se le atribuye la incorporación del cap a los mRNAs virales. (figura 2)



**Figura 2.** Organización de las proteínas y del genoma de dsRNA en las partículas de Rotavirus.

(Superior Izquierda) Estructura tridimensional de una partícula madura de rotavirus donde se muestran las tres capas proteicas. En rojo y amarillo se observa la capa externa formada por las proteínas VP4 (rojo) y VP7 (amarillo). En azul se muestra la capa intermedia formada por VP6. La capa más interna en verde representa el núcleo o core de T=2 formado por 120 copias de la proteína VP2 (Centro Superior). El borde blanco muestra dos proteínas de VP2 formando un dímero. La figura del centro superior muestra como 10 moléculas de VP2 forman un pentámero donde 5 de ellas están posicionadas cerca del eje (proteínas en rojo) y las otras 5 están alejadas del eje de simetría pentamérico (en azul). A la derecha arriba se observa en un corte de la partícula de doble cubierta como VP1 y VP3 sobresalen entre el eje formados por las 10 VP2 y como el dsRNA se organiza alrededor de estos pentámeros. (Izquierda inferior) Vista lateral de la organización en pentámeros de las dos capas mas internas de la partícula viral. Los complejos formados por VP1-VP3 se extienden como pétalos desde los pentámeros de VP2. Las características de VP2 le permiten servir de plataforma a VP1 para llevar a cabo la síntesis de RNA. En el extremo inferior derecho se muestra el canal de salida propuesta para los mensajeros sintetizados dentro de la partícula de doble cubierta. (Prasad y Estes, 2000; Prasad y cols., 1988; Prasad y cols., 1996; Lawton y cols., 1997a y b).

### **3. -Ciclo infectivo.**

#### **3.1-Entrada del virus a la célula.**

Aún no se ha podido identificar con plena exactitud el receptor celular que sirve de anclaje para Rotavirus en los tejidos epiteliales del duodeno (Ciarlet y Estes, 1999), sugiriéndose un papel relevante a glicolípidos y glicoproteínas que contienen moléculas de ácido siálico (Fukudome y cols, 1989; Smka y cols., 1992). El proceso de internalización del virus aparentemente no involucra la formación de una vacuola como es característico para otros virus sin membrana (Kaljot y cols., 1988). El ciclo infectivo de Rotavirus se desarrolla totalmente a nivel citoplasmático, por lo que cuenta con su propia maquinaria enzimática para la transcripción y la replicación de su genoma.

Una vez en el citosol, la partícula pierde su cubierta externa (VP7+VP4; fig. 3) y se ha podido demostrar que es la partícula de doble cubierta la que realiza el proceso de transcripción (figura 3; Helmberger-Jones y Patton, 1986)

#### **3.2- Síntesis de RNAs virales.**

Este proceso de pérdida de la capa externa produce una activación de la RNA polimerasa en la partícula y la síntesis de los 11 mRNAs virales (Estes, 1996). El molde del evento de transcripción lo constituye el genoma de dsRNA contenido en el interior de la subpartícula. Cada polimerasa se encarga de sintetizar el mRNA a partir del dsRNA al cual está unida. En el evento de transcripción se copia íntegramente una de las dos hebras de cada segmento, denominándose hebra negativa a la cadena molde. Durante la transcripción, los mRNAs virales son extruidos a través de canales existentes



en los vértices de las partículas, que atraviesan las capas proteicas formadas por VP6 y VP2 (Lawton y cols., 1997a).

La síntesis de los mRNAs virales puede continuar durante un período de hasta 2 horas permitiendo que una sola partícula de simple cubierta pueda producir un alto número de copias de cada mRNA viral. Esto indica que la RPR reengancha el extremo 5' luego de terminar la transcripción en el extremo 3' (Banerjee y Shatkin, 1970; Cohen, 1977; Spencer y Arias, 1981). La eficiencia de este proceso de reenganche sugiere que las proteínas del core sostienen al dsRNA por sus dos extremos aproximándolos de tal forma que el mismo funciona como un molde circular durante la transcripción. A consecuencia, el dsRNA debe estar libre para moverse dentro del core, para de así poder deslizarse a través del complejo enzimático RPR-“capping”. Estudios recientes en BTV indican que el dsRNA está formando un cristal líquido dentro del core, lo cual le entrega la fluidez necesaria para al molde para moverse durante la transcripción (Gouet y cols., 1999). Aparentemente en este proceso VP2 es imprescindible (Patton y cols., 1997) pues forma una plataforma sobre la cual el dsRNA es usado por la RNA polimerasa (Prasad y cols., 1996). Los mRNAs virales producidos durante el proceso de transcripción presentan la clásica estructura de “cap” en el extremo 5'- pero carecen de tallo de poliadenilación en su otro extremo. Estos mRNAs dirigen la síntesis de seis proteínas que forman parte de la estructura del virus maduro (proteínas estructurales) y otras seis involucradas en el proceso del ciclo viral (proteínas no estructurales). Una vez que los niveles de proteínas y mRNAs virales son suficientes, las proteínas VP1 y VP3 interactúan con los mRNAs para formar los intermediarios de pre-cores (Gallegos y

Patton, 1989). Posteriormente a la formación de los pre-cores, VP2 interactúa con ellos formando intermediarios de replicación de tipo "core". Estos intermediarios de replicación son sensibles al tratamiento con RNAsas y el efecto de las mismas provoca la reducción del tamaño de los intermediarios. Esta observación apunta a que grandes porciones de los mRNAs se encuentran extendidas fuera de las estructuras proteicas de los cores. También ha sido posible demostrar que durante la síntesis del dsRNA genómico, los intermediarios de replicación de tipo core disminuyen su tamaño (Gallegos y Patton, 1989; Patton y Gallegos, 1990; Helmberger-Jones y Patton, 1986). Estas evidencias conjuntamente con la ausencia de dsRNA viral libre dentro de la célula infectada, sugieren un escenario donde muy probablemente el proceso de síntesis de la doble hebra y el empaquetamiento del material genómico ocurren simultáneamente. De esta forma las señales de empaquetamiento para la formación del intermediario de replicación son utilizadas antes de comenzar a sintetizarse la hebra negativa. El empaquetamiento selectivo de los mRNAs del rotavirus produce una cantidad equimolar de los 11 segmentos de dsRNA (Patton y cols., 1990). Este último evento es independiente de que los 11 mRNAs no se producen de manera equimolar dentro de la célula (Stancy-Phipps y Patton, 1987), lo cual refuerza la necesidad de un sistema de selección a través de las señales de empaquetamiento.

Los mRNAs virales forman parte del dsRNA genómico, lo que provoca que el genoma viral presente una estructura "cap" en el extremo 5' de una de sus hebras (Imai y cols., 1983). Las proteínas estructurales VP1, VP2 y VP3 en conjunto con las proteínas no estructurales NSP2 y NSP5 forman parte del complejo replicativo. Ambas proteínas no

estructurales aparentemente facilitan la traslocación de los mRNAs dentro del core durante la síntesis de la cadena negativa (Taraporewala y cols., 1999; Africanova y cols., 1998).

La coinfección de células con diferentes cepas de rotavirus puede producir, en un gran número de casos, una progenie viral cuyo dsRNA genómico esta formado por una mezcla del genoma de las cepas parentales (Gombold y Raming, 1994). La formación de estos nuevos virus reordenantes indica que los mRNAs virales pueden segregarse independientemente durante el ciclo de replicación. Esto también apunta a que diferentes cepas de rotavirus tendrían comunes señales de empaquetamiento y replicación.

#### **4. - Sistema *in vitro* de transcripción de Rotavirus.**

El tratamiento de partículas virales infectivas con agentes quelantes como el EDTA producen la pérdida de la capa más externa del virus produciendo la denominada partícula de cubierta simple idéntica a aquella que en células infectadas participa en la síntesis de RNA mensajero. Este proceso acompañado de varias centrifugaciones en gradientes de CsCl permiten purificar partículas de simple cubierta que pueden ser utilizadas con éxito para sintetizar los 11 mRNAs virales *in vitro*.

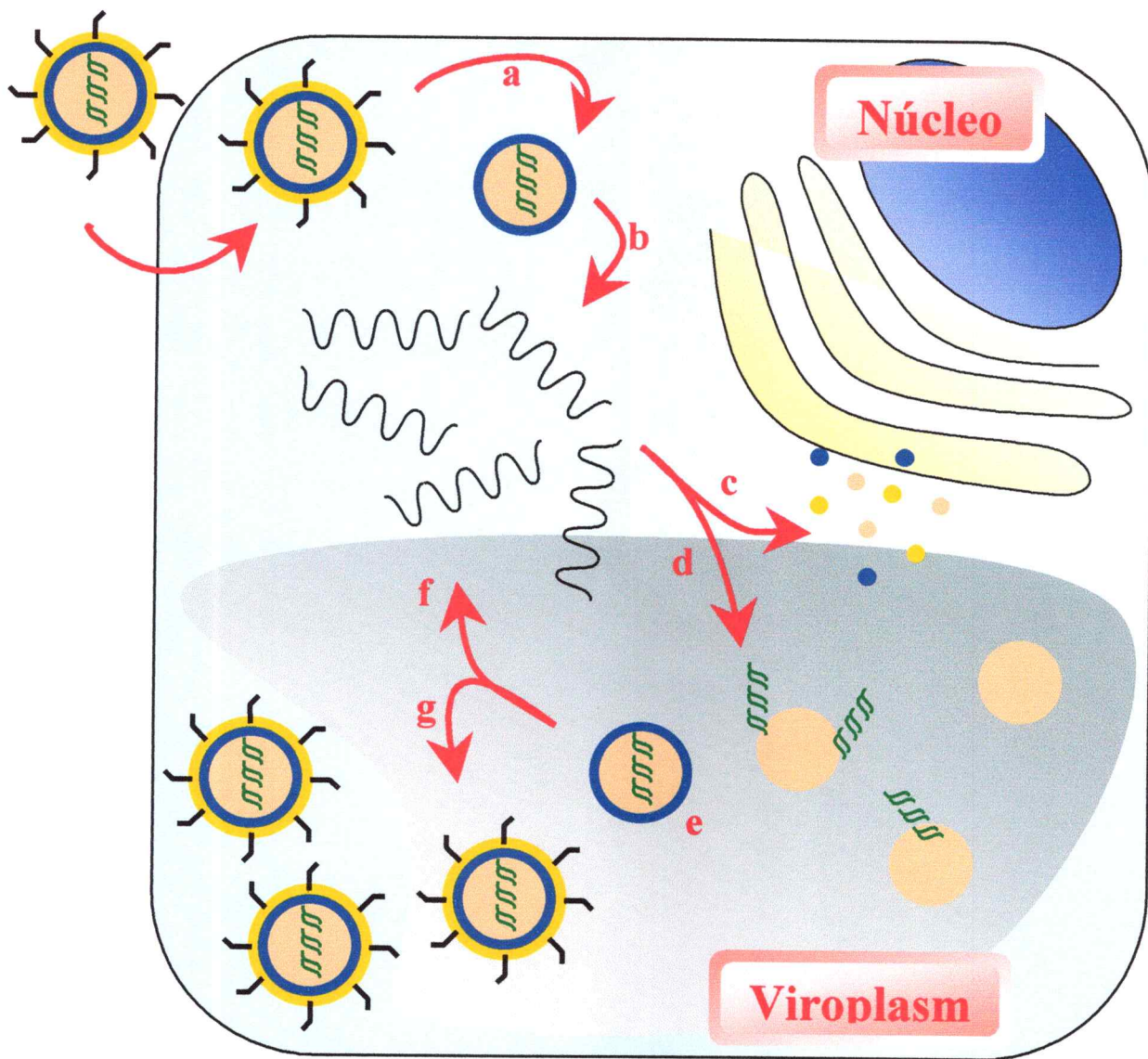
#### **5.- Sistema *in vitro* de replicación de Rotavirus.**

La caracterización de las señales en *cis*- que posibilitan la síntesis de la hebra negativa y la obtención del dsRNA genómico ha sido posible gracias al sistema de replicación libre de células y dependiente de molde desarrollado por Chen y cols. en 1994. Este sistema fue desarrollado al observar que los cores (VP1+ VP2+ VP3+ dsRNA), purificados a y

abiertos (open) mediante una incubación en un buffer hipotónico poseen una actividad replicasa. Los cores abiertos poseen una estructura parecida a "Pac-mans". Estas estructuras contienen el dsRNA genómico asociado a las proteínas VP1, VP2 y VP3. Los "open cores" en un medio de reacción adecuado utilizan su genoma para la síntesis de nuevas moléculas de dsRNA, proceso conocido como replicación endógena. Por otra parte la actividad replicasa de los "open cores" es específica y también participa en la síntesis *de novo* de la cadena negativa del genoma a partir de un mRNA exógeno. El uso de mRNAs virales que contienen deleciones o cambios en sitios específicos respecto a la secuencia viral ha permitido identificar diferentes requerimientos del uso de los mRNAs de rotavirus durante la síntesis de la cadena negativa del dsRNA viral (Patton y cols., 1996; Wentz y cols., 1996a, b). El uso de proteínas recombinantes en combinación con los "open cores" ha permitido identificar el papel de VP1, VP2 y VP3 en la síntesis del dsRNA (Patton y cols., 1997; Zeng y cols., 1996).

Debido a que los "open cores" están formados partículas virales dañadas, el producto generado por ellos no puede ser empaquetado. Esto no permite utilizar al sistema *in vitro* directamente para estudiar el proceso de empaquetamiento del dsRNA genómico. Pero, al ser la síntesis de la hebra negativa y el empaquetamiento de los 11 segmentos un evento acoplado dentro del ciclo viral hace posible que usando "open cores" en el estudio de las señales *in cis* para la replicación se obtenga también información indirecta del proceso de empaquetamiento.





**Figura 3.** Principales eventos durante el ciclo infeccioso de Rotavirus.

Una vez ocurrida la entrada del virus a la célula, se indica en el esquema: a) Pérdida de la capa externa. b) Proceso de transcripción. c) Producción de polipéptidos virales. d) Síntesis de RNA genómico. e) Producción de nuevas partículas de doble capa, capaces de f) Efectuar transcripción nuevamente o de g) Producir partículas maduras.

## 6. -Antecedentes del presente trabajo.

Los mRNAs de los rotavirus pertenecientes al grupo A varían en tamaño desde ~0.7 a 3.1kb y con la excepción del mRNA del gen 11 que usualmente contiene dos marcos de lectura, los restantes 10 mRNAs son monocistrónicos (Both y cols., 1994). El tamaño de las regiones no traducidas que aparecen en ambos extremos de los mRNAs virales (UTRs) varía considerablemente. La cepa SA11, prototipo del rotavirus, presenta UTRs en el extremo 5'- que varían entre los 9 y 49 nucleótidos de largo, mientras en el 3'- el tamaño del UTR varía desde los 17 nucleótidos hasta 182. La comparación de secuencias entre mRNAs homólogos de diferentes cepas de rotavirus mostró una alta similitud en la región de los UTRs y una menor similitud en la zona codificante (Patton y cols., 1993; Hua y cols., 1993). Sin embargo, los análisis de secuencia muestran que entre los 11 segmentos de una misma cepa no existe una identidad de secuencia. Solamente unas pocas bases están conservadas en ambos extremos de los mRNAs. En los mRNAs virales de prácticamente todas las cepas del grupo A de rotavirus el 5'- presenta la siguiente secuencia 5'-GGC(A/U)<sub>n</sub>-3', mientras que la denominada "secuencia consenso del 3'-" es 5'-UGUGACC-3'. Se ha descrito cierta variabilidad en el extremo 3'- de los mRNAs virales. La cepa SA11 presenta en el extremo 3' de los genes 2, 5 y 7 las siguientes secuencias respectivamente: UAUGACC, UGUGAACC, UGUGGCC (Mitchel y Both, 1990; Patton y cols., 2001; Both y cols., 1984). Apoyando estas observaciones, se ha podido identificar en el extremo 3'- del gen 5 de una variante de la cepa RRV la cual presenta la secuencia UGUUUC en lugar de la conservada UGUGACC (Chen y Patton, comunicación personal). De esta manera al comparar estos

extremos 3'- atípicos en mRNAs que son replicados, empaquetados y traducidos eficientemente se ha podido concluir que los nucleótidos de las posiciones -4 y -6 no cumplen una función esencial en el ciclo de vida del virus. Estos análisis de secuencia han sido complementado durante los últimos años con ensayos de replicación utilizando "open cores" y mRNAs quiméricos con deleciones o sustituciones de bases en los extremos 3'. Estos ensayos se realizan en condiciones muy diferentes a las naturales, el mRNA-quimera es añadido en exceso a la reacción, los restantes 10 segmentos no son tomados en cuenta y los cambios que producen en la estructura secundaria por las sustituciones de bases o deleciones realizadas son muy difíciles de valorar. A pesar de estos inconvenientes, se ha podido añadir claridad al papel de estas secuencia UTRs durante la replicación del virus.

Los estudios con "open cores" y mRNAs quiméricos han permitido identificar en los mRNAs de rotavirus, tres regiones que contiene información importante para la síntesis de la cadena negativa durante la replicación del genoma viral: (i) el extremo 5'- UTR, (ii) las secuencia del 3'- UTR que se encuentran río arriba a la secuencia consenso del extremo 3'-, (iii) la propia secuencia consenso del extremo 3'- (Patton y cols., 1996; Wentz y cols., 1996a). Los ensayos con mRNAs mutados han demostrado que la secuencia consenso del extremo 3'- es esencial para que ocurra el evento de síntesis de hebra negativa (Chen, 1994). La eliminación del 5'- UTR y de la región río arriba del consenso del extremo 3'- reduce marcadamente la eficiencia del proceso de síntesis de la hebra negativa, pero no evita que ocurra la síntesis. La adición de la secuencia consenso del extremo 3'- de los mRNAs virales (UGUGACC) a un RNA no relacionado con

rotavirus hace posible que este sea utilizado por los "open cores" para sintetizar su cadena complementaria. Sin embargo los niveles de replicación obtenidos con estas secuencias híbridas fueron mucho menores a los observados al usar la secuencia nativa de un mRNA de rotavirus como molde (Patton y cols., 1996). Es importante señalar que la transferencia de menos de siete nucleótidos del extremo 3' (por ejemplo, GUGACC) no es suficiente para que un RNA adquiera la capacidad de ser replicado por los "open cores". Por esto la región conservada del 3'-UTR del mRNA viral es considerada como el promotor mínimo para la síntesis de la hebra negativa.

Mediante el uso de mRNAs virales con sustituciones de bases en la región consenso de 3' UTR, se ha podido obtener una mayor información acerca de la contribución de cada uno de los nucleótidos de dicha región en el proceso de síntesis de la hebra negativa (Chen y cols., 2001). Los resultados indican que durante la replicación (i) C(-1) y el C(-2) son de gran importancia, (ii) A(-3), A(-5) y A(-7) intermedia y (iii) G(-4) y G(-6) muy poca. Los análisis de comparación de secuencias entre las diferentes variantes de rotavirus muestran C(-1) y C(-2) aparecen presente en el extremo de todos los mRNA viral secuenciados. Esta conservación corrobora el papel otorgado a CC por los experimentos con mutantes. La eliminación de estas dos bases produce un efecto letal sobre la capacidad del mRNA viral para ser usado como molde durante la síntesis de la hebra negativa (Chen y cols., 2001). El sistema de replicación también requiere que la dupla CC del extremo 3' se encuentre precisamente en el extremo del mRNA pues la adición de nucleótidos río abajo de estas dos bases interfiere significativamente con la síntesis de la hebra negativa "in vitro" (Chen y cols., 1994).

El papel de las estructuras secundarias de diferentes RNAs en la replicación y empaquetamiento de otros virus como el de la inmunodeficiencia humano (HIV) y la hepatitis B (HBV) ha sido descrito recientemente (Pappalardo y cols., 1998). La carencia de similitud de secuencia entre los 11 segmentos del rotavirus han provocado que se comience a dar una mayor importancia al papel de las estructuras secundarias presentes en los mRNAs virales. No obstante, los intentos de modelaje no ha permitido definir una estructura secundaria común para los 11 mRNAs virales. Se postula para el segmento 9 de la cepa SA11-4F, la formación de una estructura secundaria de tipo mango-sartén (panhadles) con ambos extremos interactuando entre sí (Chen y Patton, 1998). Esta estructura supone el reconocimiento de ambos extremos por la maquinaria de replicación en el evento de síntesis de la hebra negativa. Aunque en algunos ensayos se demuestra la participación del extremo 5', no existen evidencias de la necesidad de formación de esta estructura de mango y sartén para los otros 10 segmentos (Chen y Patton, 1998). Sin embargo, mediante geles de retardo se ha descrito una interacción directa del extremo 3' se ha descrito con la RNA polimerasa- RNA dependiente lo que indica una independencia en la interacción de ambos extremos con los "open cores" (Patton y cols., 1996).

La capacidad de los "open cores" de realizar una replicación endógena implica el uso de dsRNA viral como molde, probablemente mediante un mecanismo similar a la transcripción. El uso por los "open cores" de un molde de dsRNA no ha sido bien caracterizado. Se desconoce si este evento esta asociado al reconocimiento de alguna señal propia del dsRNA viral o a que luego del empaquetamiento del genoma viral este

quede anclado a la RNA polimerasa RNA dependiente, lo cual permite a la misma usar al molde genómico.

El "open core" es capaz de reconocer como molde tanto un mRNA viral como un dsRNA genómico de rotavirus. Ambos eventos de reconocimientos no están completamente caracterizados, quedando varias interrogantes aún por contestar. Tres de ellas están detalladas a continuación.

- Las señales de reconocimiento de ambos eventos.
- Existe preferencia por uno de los dos moldes.
- Existen señales de inhibición específica para el uso de cada molde.

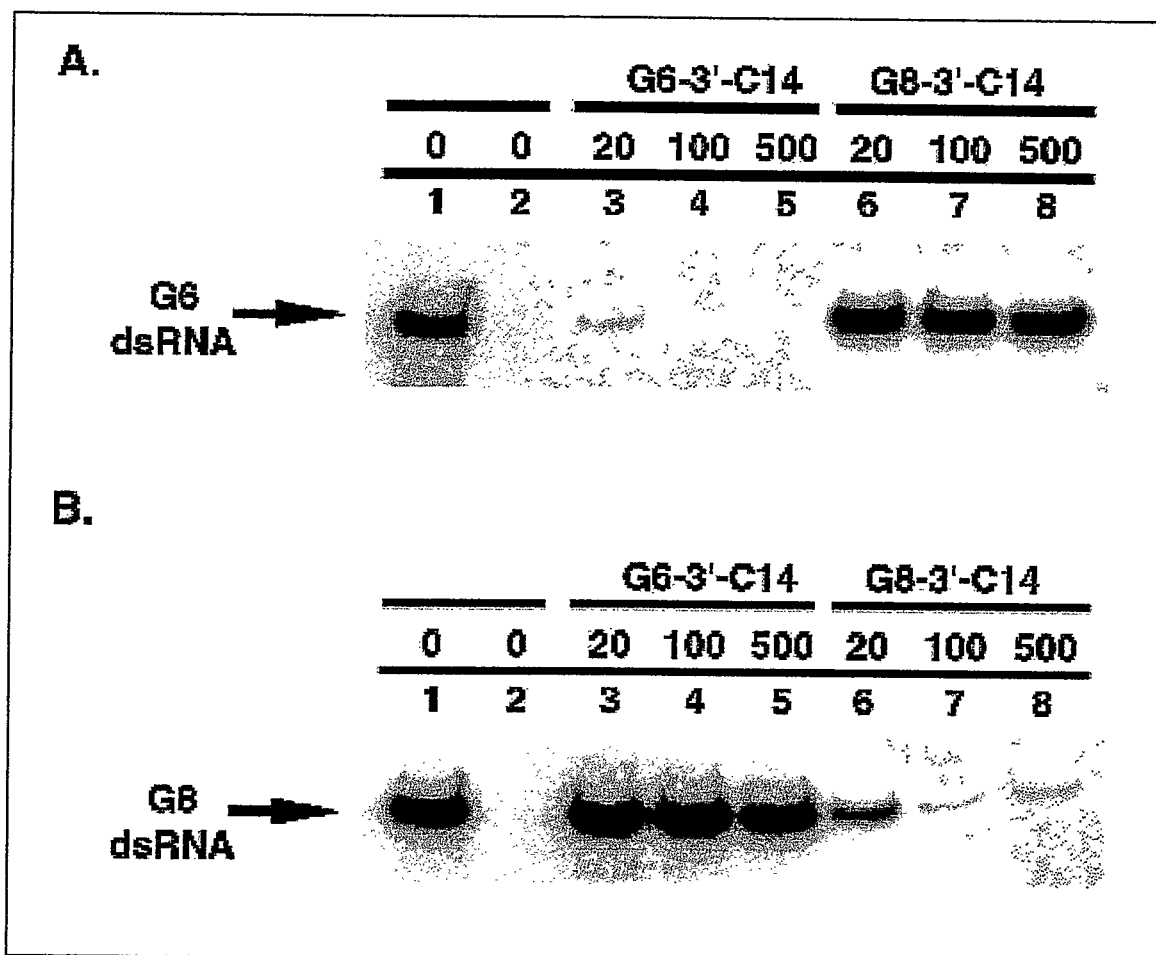
Una mejor aproximación en la caracterización de ambos eventos de replicación, podría ser el uso de los 11 segmentos virales en lugar de mRNAs quiméricos. Esta alternativa permitiría evitar los inconvenientes anteriormente señalados cuando se utilizan "open cores" en conjunto con un mRNA-quimera.

Por otra parte, el estudio de las secuencias pertenecientes a los UTRs de los mRNAs virales constituye un importante objetivo dentro de la caracterización de las señales de replicación y empaquetamientos de rotavirus. Los trabajos realizados utilizando RNAs quiméricos con sustituciones de bases, deleciones o adiciones han permitido caracterizar el papel de ambos UTRs virales y determinar el promotor mínimo de replicación (últimos siete nucleótidos del extremo 3'-). Una estrategia novedosa para abordar el estudio de diferentes regiones involucradas en la replicación del virus constituye la utilización de oligonucleótidos antisentidos contra las regiones a estudiar. Chen y cols

(2001) han utilizado con éxito una estrategia similar para demostrar la inhibición específica de la síntesis de la hebra negativa de un gen versus otro (Figura 4). Los oligonucleótidos antisentidos son de fácil diseño y manejo, lo cual permite utilizarlos contra un gen en el contexto de los 11 mRNAs virales. Además estos oligonucleótidos actúan directamente sobre el mRNA nativo lo que evita el uso de mRNA-quimeras cuyas modificaciones afectan la estructura secundaria del mRNA silvestre. Este efecto sobre la estructura secundaria dificulta la interpretación de resultados, sobre todo si se tiene en cuenta el papel tan importante que se adjudica en el empaquetamiento y replicación de otros virus (Pappalardo y cols., 1998, Frilander y Bamford, 1995).

Teniendo en cuenta los antecedentes anteriores, podemos plantearnos los siguientes objetivos para contribuir en el conocimiento de la replicación del Rotavirus.

- Caracterizar el uso del dsRNA como molde por el sistema de replicación *in vitro*.
- Determinar cuál de las regiones del extremo 3' no traducible de los RNA mensajeros del Rotavirus son importantes durante la síntesis de la hebra negativa.
- Estudiar la acción de las secuencias en *cis* del extremo 5' no traducible de los mRNAs.



**Figura 4.** Uso de oligonucleótidos antisentidos para determinar el papel del 3' del mRNA en el reconocimiento específico y en la síntesis de la hebra negativa del dsRNA genómico de Rotavirus.

Se diseñaron dos oligonucleótidos complementarios a las últimas 14 bases del extremo 3' de los genes 6 (oligo G6-3'-C14) y 8 (oligo G8-3'-C14) de la cepa SA11-4F. La figura muestra una autorradiografía de un experimento de síntesis de hebra negativa donde "open cores" tratados con nucleasa micrococcal fueron incubados separadamente con y sin mRNA del gen 6 (panel A carriles 1 y 2) y del mRNA gen 8 (panel B carriles 1 y 2) de la cepa SA11-4F. En los carriles 3 al 5 de ambos paneles concentraciones crecientes del oligo G6-3'-C14 fueron incluidas en la reacción de síntesis de hebra negativa. En los restantes tres carriles fueron ocupados concentraciones crecientes del oligo dirigido contra el extremo 3' del mRNA del gen 8.



## MATERIALES Y MÉTODOS.

### 1. - Reactivos.

tRNA levadura	SIGMA (R9001)
Proteinasa K	SIGMA (P6556)
Tripsina	SIGMA (T4799)
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P] UTP (3000 Ci/mMol)	NEN Life (Blue507H)
Tricloro-trifloroetano (Freon)	SIGMA

### 2. -Soluciones.

Buffer TBS	25 mM Tris-HCl pH 7.4, 137 mM NaCl, 7 mM KCl, 0.7 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 5.5 mM Dextrosa, 1 mM MgCl <sub>2</sub> , 1mM CaCl <sub>2</sub> ,
Buffer LSB	2 mM Tris-HCl pH 7.6, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM DTT
Buffer TE	10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA
Buffer TBE	89 mM Tris-HCl pH 8.3, 89 mM ácido bórico, 2mM EDTA
Proteinasa K	Solución acuosa 20 mg/ml
Buffer Tris Glicina	25 mM Tris pH 8.3, 250 mM Glicina
Buffer carga de mRNA 3X	95% Formamida, 0.05% azul de bromofenol, 0.05% xileno-cianol ff, EDTA 20 mM.

Buffer carga proteína 2X      100 mM Tris pH 6.8, 2%  $\beta$ -mercaptoetanol, 4% SDS,  
0.2% azul de bromofenol, 20% glicerol.

### **3. - Material Biológico.**

#### *-Cepas virales.*

Las cepas SA11-4F y DxRRV de Rotavirus fueron gentilmente donadas por el Dr. John Patton del Instituto Nacional de Salud Pública de los Estados Unidos de Norteamérica. -

#### *-Células.*

La línea celular MA-104, derivada de fibroblastos de riñón de mono verde fue utilizada en todos los ensayos de cultivo del Rotavirus.

#### *-Ácidos Ribonucleicos (RNA).*

El dsRNA del Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa fue gentilmente donado por el grupo de investigaciones que dirige la Dra. Ana María Sandino del departamento de Bioquímica de la Facultad de Química y Biología de la Universidad de Santiago.

El RNA de la Mauriceville fue donado generosamente por la Dra. Alejandra Moene del departamento de Bioquímica de la Facultad de Química y Biología de la Universidad de Santiago.

### **4. - Cultivo de Células MA-104.**

Para el crecimiento de la línea celular MA-104, fueron sembradas aproximadamente  $30 \times 10^3$  células por  $\text{cm}^2$  de superficie y se mantuvieron en medio mínimo de EAGLE

(MEM) en presencia de 5% de suero fetal bovino (SFB) por 18 horas. Cuando indicado, el medio fue substituido por MEM sin suero.

#### **5. - Infección y propagación de cepas virales de rotavirus.**

Previo a su infección, las cepas de rotavirus fueron activadas por tratamiento con Tripsina a una concentración final de 10 µg/ml durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente, el inóculo fue diluido en MEM hasta alcanzar la multiplicidad de infección (M.O.I.) deseada, medida en u.f.p./cél. (unidades formadoras de placa por célula). Este inóculo fue sembrado en monocapas confluentes de células MA-104, previamente lavadas con PBS. Después de una hora de adsorción con agitación leve cada diez minutos, el inóculo fue removido y las monocapas mantenidas en MEM sin suero.

Cuando indicado, el proceso de infección fue detenido, por congelamiento o lisis. Para propagación, utilizando M.O.I. de 5 u.f.p./cél., se esperó hasta observar un efecto citopático en más de 80% de las células (24 horas).

#### **6. - a) Purificación de partículas de simple cubierta (single shelled).**

Se infectaron 50 botellas de cultivos de 175 cm<sup>2</sup> de monocapas de células confluentes de MA-104 como se detalla en el punto anterior. Las infecciones se realizaron utilizando 5 u.f.p./cél. y se esperó hasta la caída del 100% de la monocapa celular (24 a 30 horas).

Las células y restos celulares aún adheridos a la botella fueron raspados utilizando un rastrillo de teflón para asegurar la total recuperación de la progenie viral. A continuación los lisados celulares fueron trasvasados a tubos cónicos de 50ml y conservados a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Luego de congelar y descongelar dos veces el contenido de los tubos cónicos, se recolectó el volumen total en botellas de vidrio de 500ml. Cada botella fue incubada a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora en una concentración final de 50mM de EDTA para extraerle al virus la capa externa compuesta por VP7 y VP4. A partir de este momento se coloca todo el material en hielo para asegurar una temperatura inferior a  $4^{\circ}\text{C}$ . En una juguera convencional se mezclaron 250ml de tricloro-trifloroetano (freón) frío con 250ml del lisado. La mezcla se agitó vigorosamente en la juguera durante 20 segundos tres veces con intervalos de 3 minutos en hielo. Luego de tratar todo el volumen con freón, se separaron las fases mediante centrifugación a 5000 rpm durante 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  y se recuperó la fase acuosa. Posteriormente se procedió a concentrar las partículas virales de simple cubierta mediante una centrifugación a 25000 rpm durante 2 horas a  $4^{\circ}\text{C}$ . Es conveniente concentrar el virus en pocos tubos de centrifuga para facilitar el próximo paso de resuspensión. Resuspender el precipitado en 4 ml de buffer TBS frío y añadir ClCs a una concentración final de 1.37g/ml ( $\cong$  2.16g totales de CsCl). Centrifugar hasta obtener el gradiente de densidad (50000 rpm, 18 horas,  $10^{\circ}\text{C}$ , sin freno). Luego de la ultra centrifugación se observa una banda horizontal de color blanco cerca del centro del tubo de centrifuga. Esta banda contiene las partículas de simple cubierta a purificar. Perforar el fondo del tubo y extraer muy lentamente por goteo alícuotas de 500  $\mu\text{l}$ . Medir el índice de refracción de cada alícuota y separar aquellas que corresponden a una

densidad entre 1.393 y 1.382 g/ml. Para realizar el cálculo de densidad a partir del índice de refracción se utilizó la siguiente fórmula.

$$\rho = (10.8601 * \eta) - 13.4974$$

Siendo  $\eta$  el índice de refracción medido y  $\rho$  la densidad de la mezcla.

Se reunió las fracciones escogidas y completar a volumen final de 4 ml con buffer TBS.

Se realizó un segundo gradiente, similar al anterior. Es importante tener en cuenta al completar el CsCl hasta una densidad final de 1.37g/ml que las fracciones contienen una densidad de CsCl proveniente del anterior gradiente. Se obtuvo la fracción de la banda blanca que ha su vez correspondía con la densidad de la cepa de rotavirus utilizada (Chen y Ramig 1992)

Se completó el volumen de la fracción seleccionada con buffer TBS hasta un volumen final de 1 ml. El virus fue dializado contra 200 ml de buffer TBS a 4°C durante 12 horas con cambios de buffer de diálisis cada 3 horas aproximadamente. Una vez colectada la muestra dializada se tiene partícula de simple cubierta lista para los ensayos de transcripción "*in vitro*". Estas subpartículas fueron analizadas en geles de poliacrilamida- Tris Glicina- SDS para estimar su concentración e integridad (Laemmli, 1970). La concentración final se obtuvo por el método de Bradford (Bradford, 1976). Las partículas de simple cubierta se conservaron etiquetadas a 4°C para su posterior uso.

#### **6. - b) Obtención de "open cores".**

La muestra de partículas de simple cubierta se le completó el volumen a 1.5 ml con buffer TBS para entonces añadirle igual volumen de  $\text{CaCl}_2$  2M (libre de nucleasas). La mezcla fue incubada a  $37^\circ\text{C}$  durante 1 hora, agitándola cada 10 minutos. Durante este paso VP6 es liberada de la subpartícula por lo que la solución se muestra espumosa. Los cores virales son centrifugados durante 10 minutos a  $4^\circ\text{C}$  y 14000 rpm. El sobrenadante es desechado y el precipitado lavado con 1ml de  $\text{CaCl}_2$  1M. El precipitado se resuspendió en 1 ml de buffer LSB con mucha dificultad. Esta solución tiene un aspecto turbio pero va ganando en transparencia con la resuspensión y apertura de los cores. Para lograr esto último se dializaron exhaustivamente contra 200ml de LSB a  $4^\circ\text{C}$  hasta por dos días. Una vez colectada la muestra dializada se tienen "open cores" listos para los ensayos de transcripción "*in vitro*". Estas subpartículas fueron analizadas en geles de poliacrilamida- Tris Glicina- SDS para estimar su concentración e integridad (Laemmli, 1970). La concentración final se obtuvo por el método de Bradford (Bradford, 1976). Los "open cores" se conservaron etiquetadas a  $4^\circ\text{C}$  para su posterior uso.

#### **7. - Síntesis *in vitro* y purificación de mRNAs totales de rotavirus.**

Subpartículas de simple cubierta (40  $\mu\text{g}$ ) fueron incubadas en una mezcla de reacción de 500  $\mu\text{l}$  volumen final y 120 mM Tris-HCl (pH 8.5), 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 40 mM NaCl, 0.1 mM S-adenosilmetionina y 0.2 mM ATP, CTP, GTP y UTP. La mezcla se incubó por 2 horas a  $45^\circ\text{C}$ . Para separar las subpartículas de los mRNAs sintetizados, la mezcla se ultra centrifugó a 40.000 rpm por 2 horas y a  $4^\circ\text{C}$ . Al sobrenadante colectado se le realizó un

procedimiento de extracción fenólica, seguido de una doble extracción con cloroformo. La fase acuosa fue colectada y el mRNA precipitado con 1/10 volumen de NaCOOH 3M pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol frío durante 12 horas a  $-70^{\circ}\text{C}$ . El precipitado se lavó en etanol 75% para luego resuspenderlo en 900  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  libre de nucleasas. Para eliminar el dsRNA genómico se procedió a precipitar con 2M LiCl durante 18 horas a  $4^{\circ}\text{C}$ . La mezcla de precipitación se centrifugó a 14.000 rpm durante 45 minutos a  $0^{\circ}\text{C}$ . El precipitado se resuspendió en 100  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  libre de nucleasas para ser re-precipitado en 200 mM NaCl y 10 volúmenes de etanol. Los mRNAs virales precipitados se lavaron con etanol al 75% y se resuspendieron en 100  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  libre de nucleasas. Los mRNAs virales fueron conservados a  $-70^{\circ}\text{C}$  y se analizó su integridad y pureza en geles de poliacrilamida 7% y urea 7.5M. La cuantificación se realizó mediante la medición de absorbancia a 260 y 280 nm en un GeneQuant (Pharmacia).

#### **8. - Ensayo de replicación *in vitro*.**

El ensayo es similar al descrito por Chen y cols (1994) con algunas modificaciones. La mezcla de reacción (10  $\mu\text{l}$ ) contiene 55 mM de Tris-HCl pH 8.2, 12 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2% polietilenglicol 6000, 10 U de RNAaseOut (GibcoBRL), 60  $\mu\text{M}$  de ATP, CTP y GTP, 2.0  $\mu\text{Ci}$  [ $\alpha$ - $^{32}$  UTP] (3000 Ci/mmol) y 0.5  $\mu\text{g}$  de "open core" virales. A la mezcla de reacción se le añadió mRNAs virales ó dsRNA genómico según el objetivo del experimento. La reacción se incubó durante 2 horas a  $32^{\circ}\text{C}$  y se detuvo con 10  $\mu\text{l}$  de buffer carga para proteínas 2X.

## **9. - Purificación de dsRNA genómico de rotavirus.**

Se infectaron 10 botellas de cultivos de 175 cm<sup>2</sup> de monocapas de células confluentes de MA-104 como se detalla anteriormente. Las infecciones se realizaron utilizando 5 u.f.p./cél. y se esperó hasta la caída del 100% de la monocapa celular (24 a 30 horas). Las células y restos celulares aún adheridos a la botella fueron raspados utilizando un rastrillo de teflón para asegurar la total recuperación de la progenie viral. A continuación los lisados celulares fueron trasvasados a tubos cónicos de 50ml y conservados a -70°C. Luego de congelar y descongelar dos veces el contenido de los tubos cónicos, se recolectó el volumen total en botellas de vidrio de 500 ml. En una juguera convencional se mezclaron 250 ml de tricloro-trifloroetano (freón) frío con 250 ml del lisado. La mezcla se agitó vigorosamente en la juguera durante 20 segundos tres veces con intervalos de 3 minutos en hielo. Luego de tratar todo el volumen con freón, se separaron las fases mediante centrifugación a 5 000 rpm durante 10 minutos a 4°C y se recuperó la fase acuosa. Posteriormente se procedió a concentrar las partículas virales de simple cubierta mediante una centrifugación a 25 000 rpm durante 2 horas a 4°C. El precipitado fue resuspendido en 300 µl de buffer TE y fue digerido en una concentración final de 100 µg/ml de Proteinasa K y SDS 0.5% a 55°C durante 30 minutos. Luego de esto, la mezcla fue extraída sucesivamente con fenol, fenol-cloroformo, cloroformo y precipitada con 1/10 volumen de NaCOOH 3M pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol frío durante 12 horas a -70°C. Luego de un lavado con 75% etanol, el dsRNA genómico precipitado fue resuspendido en 100 µl de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas. Los RNAs genómicos



fueron conservados a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se analizó su integridad y pureza en geles de poliacrilamida 12%. La cuantificación se realizó mediante la medición de absorbancia a 260 y 280 nm en un GeneQuant (Pharmacia).

#### **10. - Electroforesis y tinción de RNAs.**

Para el estudio de los productos de replicación se utilizaron geles de poliacrilamida-Tris Glicina-SDS al 12% similares a los utilizados para el estudio de proteínas (Laemmli, 1970). Los mRNAs virales fueron analizados en geles de 7% poliacrilamida-Urea-TBE. Luego de la electroforesis, los RNAs se visualizaron a través de una tinción con plata específica para ácidos nucleicos (Herring y cols., 1982).

#### **11. - Análisis cuantitativo de emisiones.**

Todo el material marcado con radioisótopos fue analizado por electroforesis. Previo a la autorradiografía, los geles fueron secados sobre papel filtro y sometidos al análisis en un radio-escáner PhosphoImager BIORAD GS-525. Como resultado se obtuvieron patrones de radioactividad del gel que fueron posteriormente analizados con el programa Molecular Analyst (BIORAD). Esto permitió la cuantificación precisa de la radiactividad en cada banda del gel. Las medidas se obtienen en unidades arbitrarias del equipo, proporcionales a la emisión.

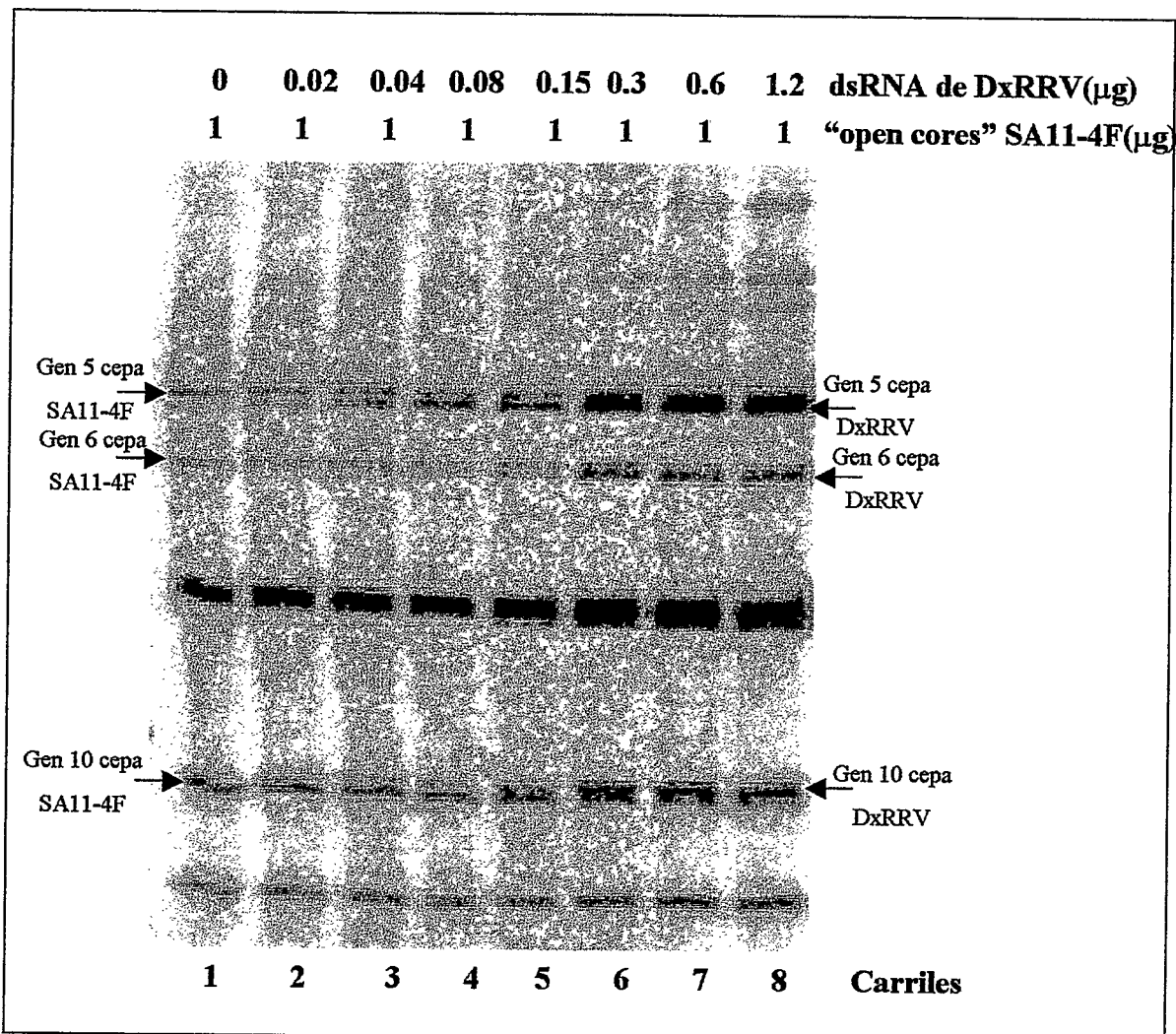
Para el análisis, cada banda cuantificada fue corregida contra el fondo. La comparación entre carriles se hizo previo a la normalización respecto a una banda constante en el gel.

## RESULTADOS.

### 1- Estudio de la capacidad de los "open cores" de utilizar un molde de dsRNA genómico.

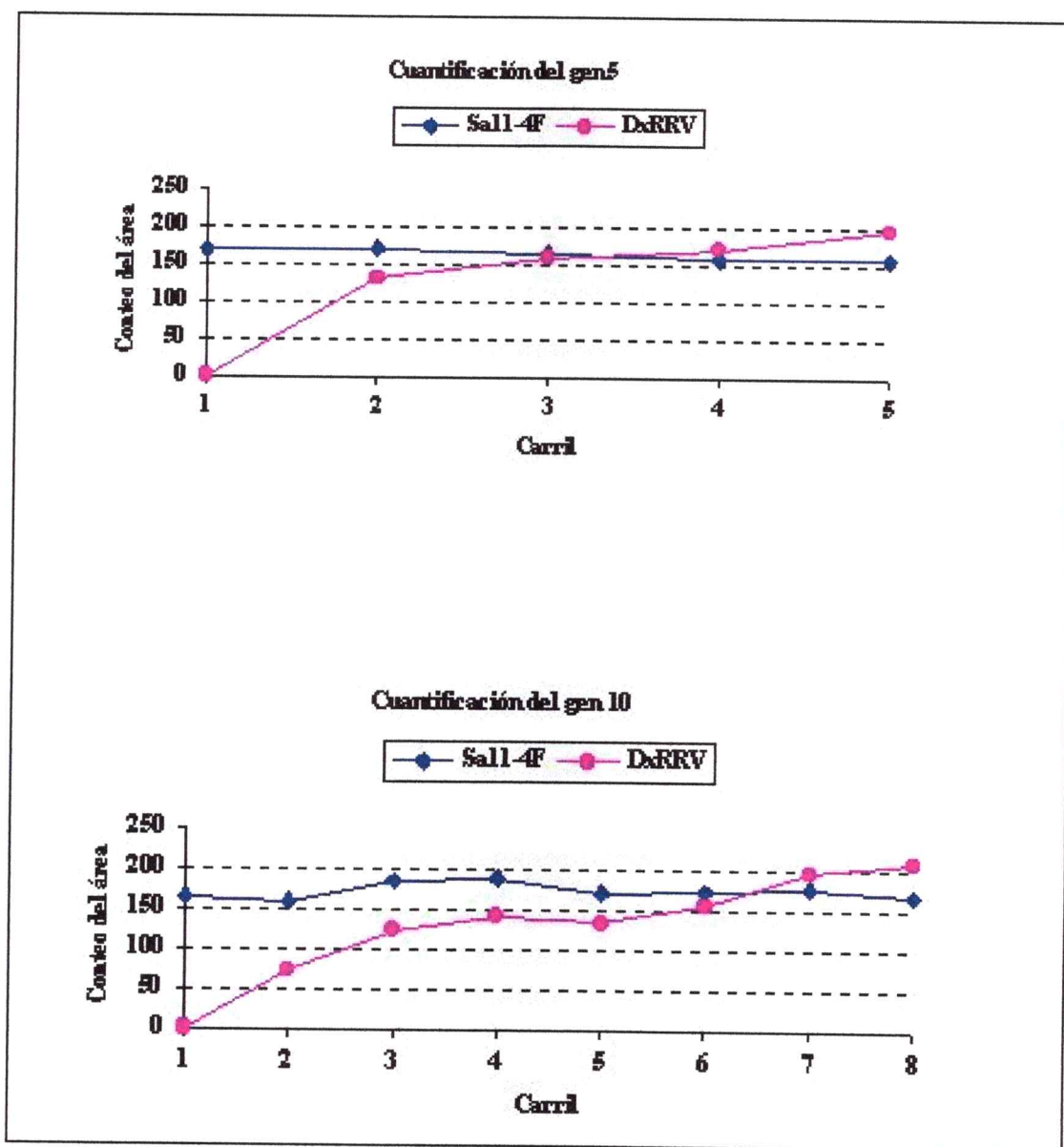
La capacidad de los "open cores" de utilizar el dsRNA genómico contenido en su interior como molde ha sido comprobada experimentalmente. Este evento se conoce como replicación endógena. Para una mejor caracterización de la capacidad de los "open cores" de utilizar dsRNA como molde se realizó el siguiente experimento. "open cores" provenientes de la cepa de rotavirus SA11-4F fueron incubados en condiciones controladas de replicación "in vitro" y en presencia de [ $\alpha^{32}$ -P]UTP con cantidades crecientes de dsRNA genómico obtenido a partir de la cepa DxRRV. Los productos de la reacción se aplicaron en geles de poliacrilamida y luego se sometió a una autorradiografía. En la figura 5 se observa que al añadir cantidades crecientes de dsRNA de DxRRV comienza aparecer el electroferotipo característico de esta cepa. En el primer carril (de izquierda a derecha) se muestran las bandas correspondientes a los productos de replicación endógena del open core SA11-4F. Para distinguir una cepa de la otra, fueron señalados los genes 5, 6 y 10 pues son los que muestran mayores diferencias de migración electroforética. Una vez analizada la autorradiografía se procedió a cuantificar las señales correspondientes a los genes 5 y 10 de ambas cepas. Como se mencionó anteriormente, estos dos genes muestran diferencias en los patrones de migración para la cepa SA11-4F y DxRRV, lo cual facilitó su cuantificación. La figura 6 muestra dos gráficos con los resultados de la cuantificación de las bandas correspondientes mencionados.

Como se puede observar el sistema de "open cores" utilizó como molde un dsRNA heterólogo añadido de manera exógeno. Los resultados mostrados en la figura 6 indican que no existe un desplazamiento en el uso del dsRNA endógeno. El sistema mantiene los niveles de replicación endógena y utiliza adicionalmente el dsRNA exógeno, con el incremento de este en la reacción. Esto podría deberse a la presencia de partículas de 'open core' vacías o de complejos de replicación (VP1-VP2-VP3) que han perdido su dsRNA genómico y pueden utilizar como molde el dsRNA de DxRRV. Los resultados indican que el sistema de replicación endógena no es desplazado al añadirle un molde de similares características.



**Figura 5.** Uso de dsRNA genómico de Rotavirus como molde por los "open cores".

Autorradiografía de un gel de poliacrilamida-Tris Glicina 12% donde fueron analizados los productos de las reacciones en las que "open cores" provenientes de la cepa de rotavirus SA11-4F fueron incubados en condiciones indicadas de replicación "in vitro" y en presencia de [ $\alpha^{32}$ -P]UTP con cantidades crecientes de dsRNA genómico obtenido a partir de la cepa DxRRV. El carril 1 es un control de replicación endógena donde se observan los segmentos provenientes de la cepa SA11-4F. Los genes 5, 6 y 10 de cada cepa aparecen señalados a ambos lados de la figura.



**Figura 6.** Cuantificación del producto relativo de los genes 5 y 10 de las cepas SA11-4F y DxRRV en ensayos donde el uso de un dsRNA genómico exógeno es evaluado versus el endógeno.

Las bandas correspondientes a los genes 5 y 10 de las cepas SA11-4F y DxRRV fueron cuantificadas y graficados los resultados. El eje de las abscisas contiene el conteo de área en unidades propias del phosphoimager, mientras que cada valor del eje horizontal corresponde con los carriles señalados en la figura 4.

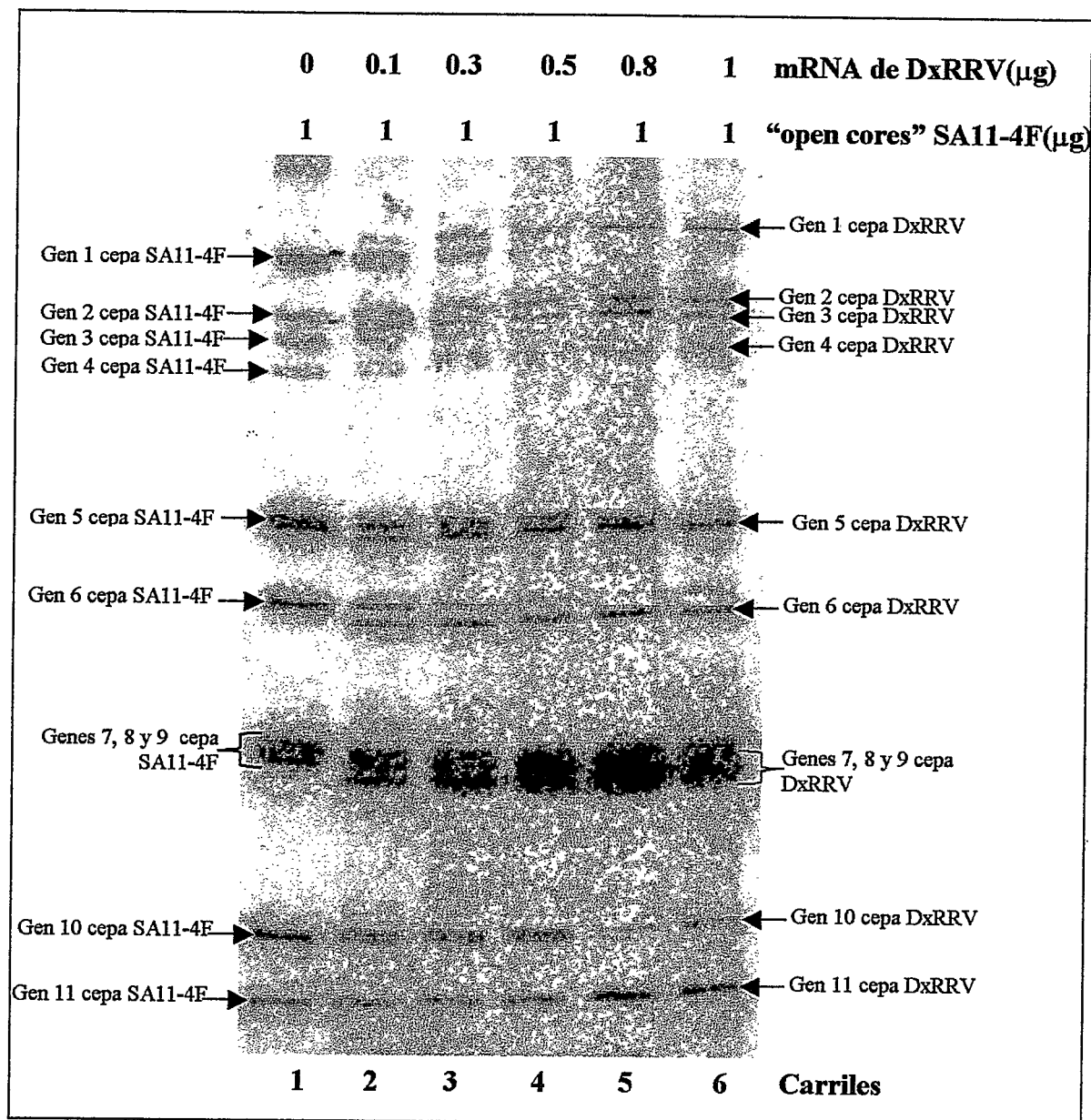
## **2- Comparación del uso del mRNA exógeno versus el dsRNA endógeno por los “open cores”.**

La capacidad de los “open cores” de utilizar un RNA de simple hebra como molde de replicación para la síntesis de la hebra negativa ha sido estudiada utilizando “open cores” vacíos y mRNA-quimeras. Sin embargo, se desconoce el efecto sobre la replicación endógena de la presencia de los 11 segmentos de simple hebra positiva. Con el objetivo de caracterizar la capacidad de los “open cores” de utilizar mRNA como molde y su efecto sobre la replicación endógena se realizó el siguiente experimento. “open cores” provenientes de la cepa de rotavirus SA11-4F fueron incubados en condiciones controladas de replicación “in vitro” y en presencia de [ $\alpha^{32}$ -P]UTP con cantidades crecientes de una preparación de mRNA total de la cepa DxRRV. Los productos de la reacción se aplicaron en geles de poliacrilamida y luego se sometió a una autorradiografía. En la figura 7 se observa que al añadir cantidades crecientes de mRNA de DxRRV comienza aparecer el electroferotipo característico de esta cepa. En el primer carril (de izquierda a derecha) se muestran las bandas correspondientes a los productos de replicación endógena del open core SA11-4F. Para distinguir una cepa de la otra, fue señalado el gen 5. La figura 8 muestra la cuantificación de las bandas correspondientes a los genes 5 para cada cepa y en cada una de las condiciones estudiadas.

Como se observa en la figura 7 el sistema de “open cores” de la cepa SA11-4F utilizó mRNAs de la cepa DxRRV como moldes en la síntesis de la hebra negativa. Este resultado nos indica la presencia de una señal común entre los mRNAs de ambas cepas durante la síntesis de la hebra negativa. Resultados similares se obtuvieron al utilizar

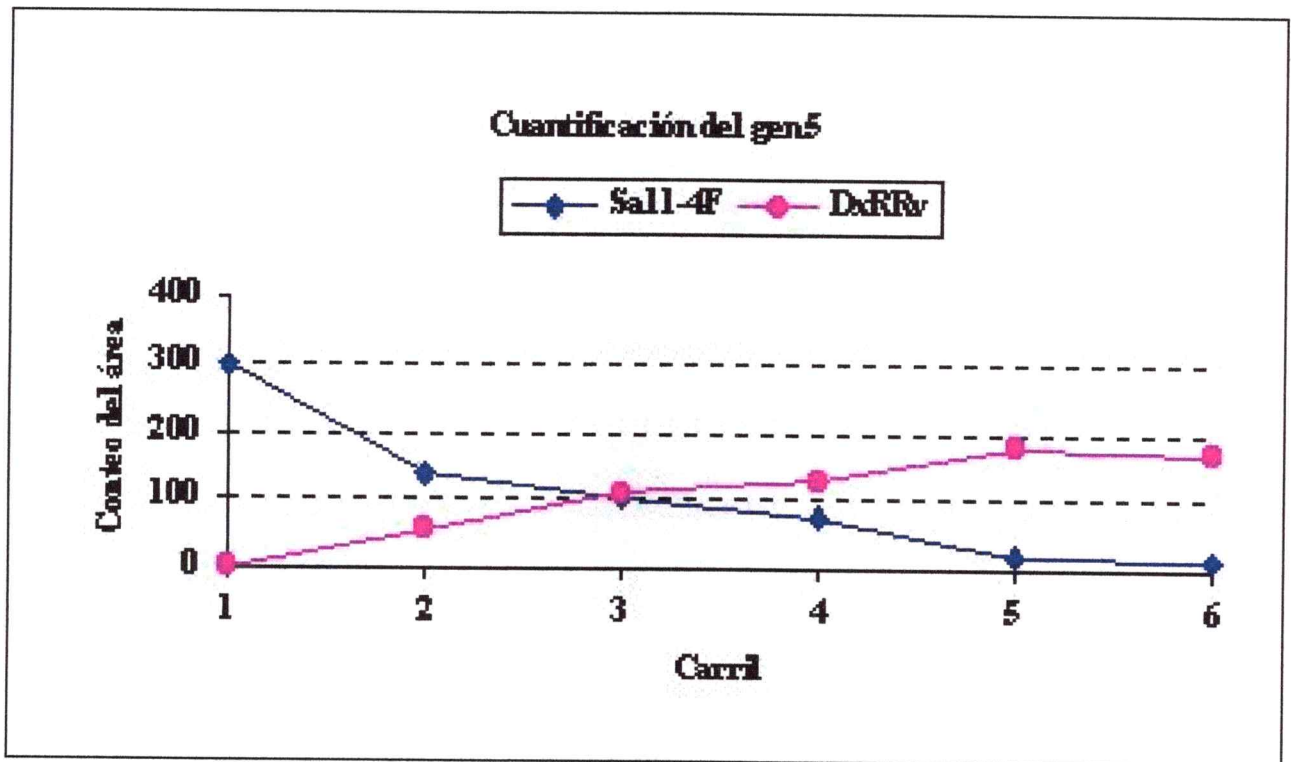
“open cores” de DxRRV y mRNAs de SA11-4F (Datos no mostrados), lo cual indica que los mRNAs portan señales generales para el reconocimiento y síntesis de la hebra negativa viral. La cuantificación de los productos de este experimento mostró resultados sorprendentes. La gráfica muestra como en el caso del gen 5 a medida que aumenta la cantidad de mRNA de DxRRV en la reacción, también aumenta la síntesis del gen 5 de esta cepa. Sin embargo, el gen 5 producto de la replicación endógena del dsRNA SA11-4F va desapareciendo con el aumento de las cadenas positivas en la reacción. Este mismo resultado se obtiene para el gen 6 y se puede comprobar visualmente en la autorradiografía del gel. Por lo tanto, el mRNA total de la cepa DxRRV está siendo usado de forma preferencial sobre el dsRNA endógeno del propio “open core”. Las condiciones estudiadas en los carriles 2, 3 y 4 de la figura 7 serán de mucha utilidad en nuestro trabajo pues en una sola reacción se combina la replicación endógena con el uso de la hebra positiva como molde. De esta manera podríamos mediante el uso de inhibidores estudiar ambos eventos en una sola reacción. Por otra parte en los carriles 5 a 6 de la misma figura se observa como desaparece la replicación endógena, comportándose como “open cores” vacíos. Este hallazgo nos permite no depender del uso de “open cores” vacíos los cuales hemos visto son menos eficientes al estar contaminados con restos de nucleasa micrococcal, la cual es usada para “vaciarlos”(degradar el dsRNA endógeno).





**Figura 7.** Uso preferencial del mRNA total de la cepa DxRRV como molde por "open cores" de SA11-4F con replicación endógena residual.

Autorradiografía de un gel de poliacrilamida-Tris Glicina 12% donde fueron analizados los productos de las reacciones en las que "open cores" provenientes de la cepa de rotavirus SA11-4F fueron incubados en condiciones indicadas de replicación "in vitro" y en presencia de [ $\alpha^{32}$ -P]UTP con cantidades crecientes de los 11 mRNAs obtenido a partir de la cepa DxRRV. El carril 1 es un control de replicación endógena donde se observan los segmentos provenientes de la cepa SA11-4F. El gen 5 de cada cepa aparece señalado a ambos lados de la figura.



**Figura 8.** Cuantificación del producto relativo del gen 5 de las cepas SA11-4F y DxRRV, mostrando el uso preferencial del mRNA del DxRRV sobre el dsRNA endógeno.

Las bandas correspondientes al gen 5 de las cepas SA11-4F y DxRRV fueron cuantificadas y graficados los resultados. El eje de las abscisas contiene el conteo de área en unidades propias del phosphoimager, mientras que cada valor del eje horizontal corresponde con los carriles señalados en la figura 7.

### **3- Estudio de la replicación de la hebra negativa del gen 5 en el contexto de la síntesis de los 11 dsRNA.**

Una aproximación experimental para determinar la importancia del extremo 3' mRNA en el reconocimiento específico y en la síntesis de la hebra negativa del dsRNA genómico del Rotavirus puede ser el uso de oligonucleótidos antisentidos complementarios a diferentes regiones de este extremo. El uso de estos oligos antisentidos nos permitirán estudiar su efecto en la síntesis de la hebra negativa de un solo gen en un sistema donde se encontrarán los 10 restantes segmentos. Esto último permitirá evaluar la especificidad de la inhibición y el impacto de la misma en la síntesis de los otros genes.

Se diseñó un oligo antisentido de 21 bases contra el extremo 3' del mRNA del gen 5 de la cepa SA11-4F (oligo G5 3'-C21) (Ver Tabla 1). Se seleccionó el extremo como primer blanco pues los antecedentes apuntaban a que las últimas bases tenían un papel importante en el inicio de la síntesis de la hebra negativa. Este oligo fue utilizado en concentraciones crecientes en dos ensayos diferentes de replicación (Figura 9). En cada carril del panel A, 0.5µg de "open core" de la cepa DxRRV fueron utilizados para sintetizar la hebra negativa de 200ng de mRNA total de SA11-4F. En el panel B los "open cores" utilizados pertenecen a la cepa SA11-4F y el mRNA añadido a la reacción proviene del DxRRV.

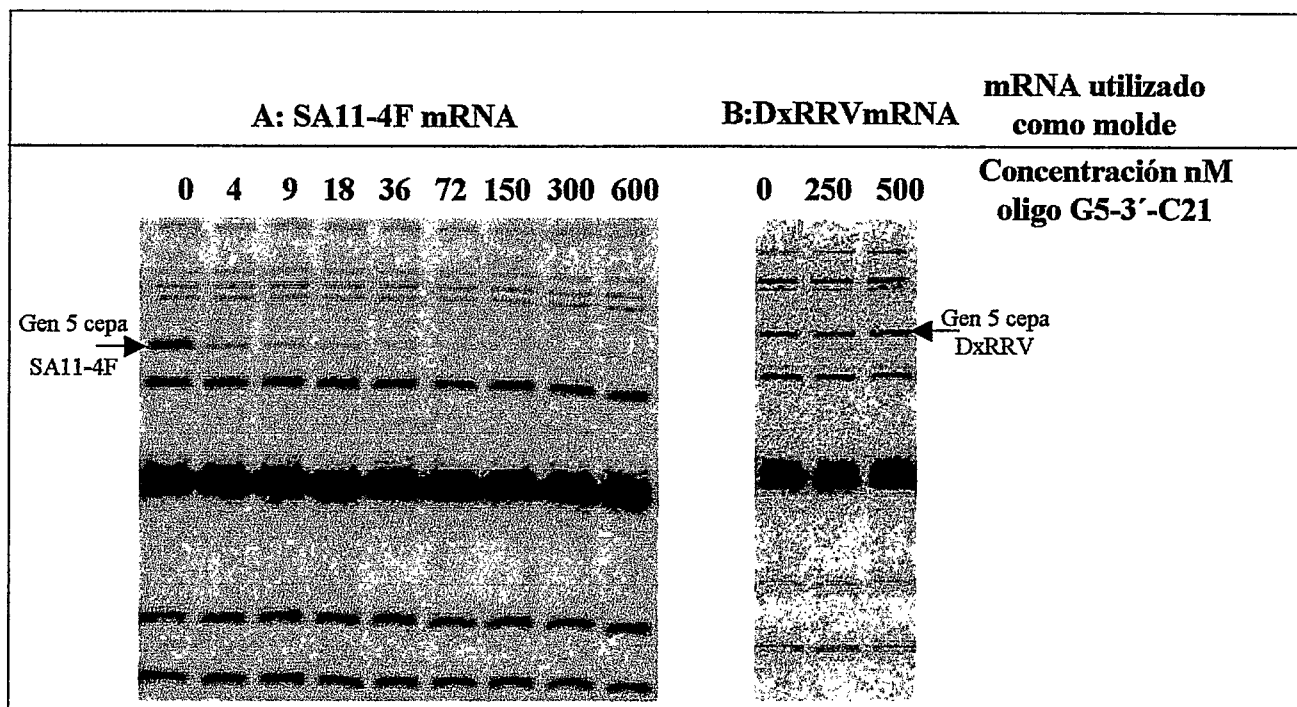
El resultado de este ensayo muestra como el oligo G5 3'-C21 es capaz de inhibir específicamente la síntesis de hebra negativa del gen contra el cual está dirigido (Figura 9 panel A). No se observa ningún efecto inhibitorio sobre la síntesis de los otros 10

genes incluso a concentraciones de 600nM. El panel B de la figura 9 muestra como la síntesis de la hebra negativa del mRNA del gen 5 de la cepa DxRRV no es afectada por el oligo. Las diferencias de secuencias entre los extremos 3' de los genes 5 de las cepas DxRRV respecto a la SA11-4F son: (contando a la primera C del extremo 3' de la cepa SA11 como la base 1) en la posición 3 la cepa SA11-4F presenta una A mientras la DxRRV una G, en posición 5 hay un cambio de una G en SA11 por una A en DxRRV, en la 19 una G por una A, posición 20 SA11-4F tiene una U que en DxRRV es una C, los otros cambios son, 40 (G por A) y 41 (U por C). Además de estas diferencias la U de la posición 11 de SA11-4F está deletada en DxRRV. Por lo tanto entre el gen 5 de ambas cepas existen 4 diferencias en los últimos 21 nucleótidos (Ver recuadro a continuación).

G5 mRNA	3' -CCAAGUGUCAUAAAACGGUCGAUCCGCGAUGAGAUCAGACCU-5' (extremo 3' SA11-4F)
G5 mRNA	3' -CCgAaUGUCA-AAAACGacCGAUCCGCGAUGAGAUCAGguCU-5' (extremo 3' DxRRV)

Estas diferencias en los extremos 3' - permitió a través de un oligo antisentido producir una inhibición total del gen blanco del oligo sin afectar el uso de los otros 10 mRNAs como molde.

El experimento anterior muestra que el sistema de replicación requiere el extremo de cada mRNA en forma de simple hebra para poder sintetizar la hebra negativa. La señal presente en el extremo del gen 5 es específica y se debe a la interacción del oligo a una región complementaria, presente solo en este gen y en esta cepa.



**Figura 9.** Efecto de un oligonucleótido antisentido dirigido contra las últimas 21 bases del extremo 3' del gen 5 de la cepa SA11-4F sobre la síntesis de la hebra negativa de las cepas SA11-4F y DxRRV.

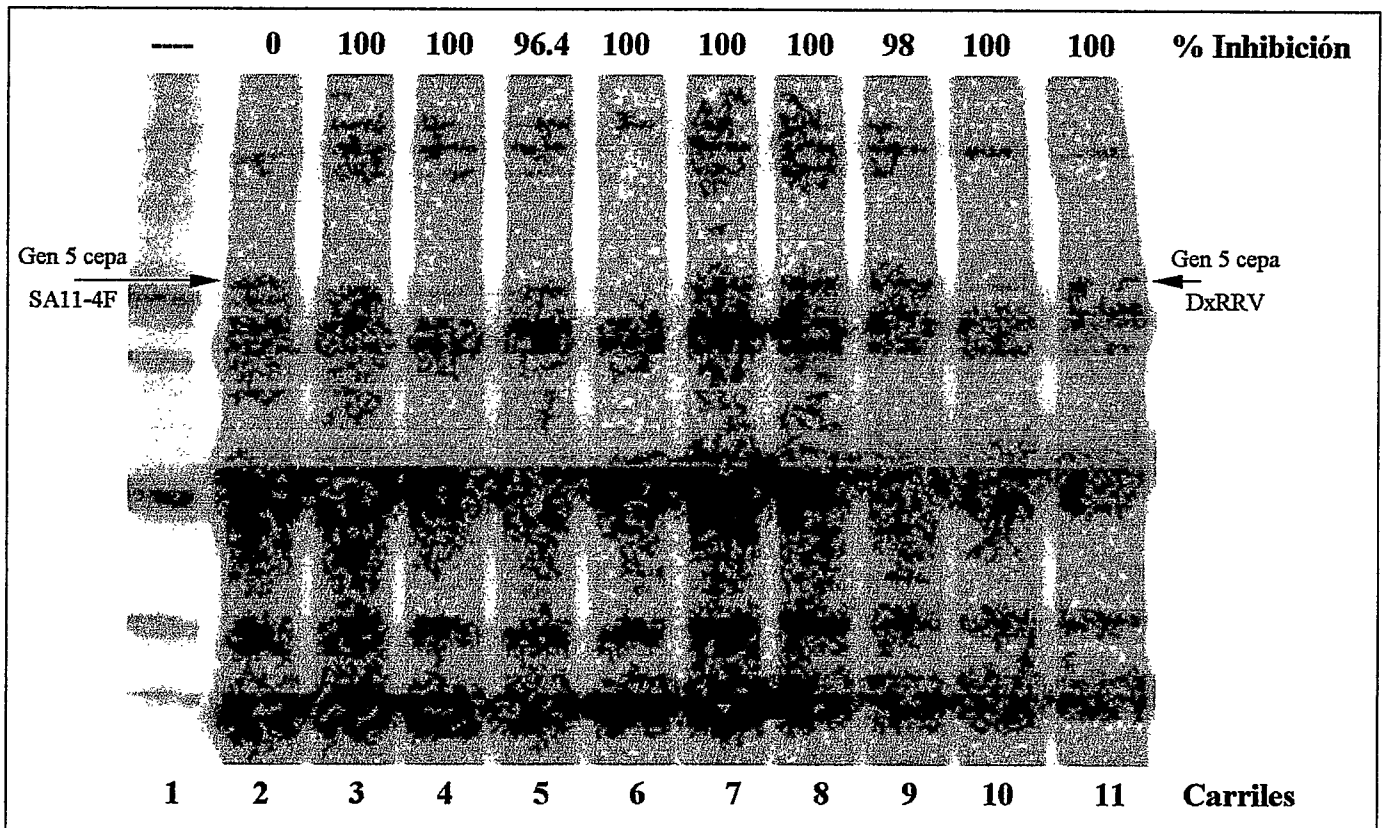
**Panel A:** Autorradiografía de un gel de poliacrilamida-Tris Glicina 12% donde fueron analizados los productos de las reacciones en las que "open cores" provenientes de la cepa de rotavirus DxRRV fueron incubados en condiciones indicadas de replicación "in vitro", en presencia de [ $\alpha^{32}$ -P]UTP, de 200ng de los 11 mRNAs obtenidos a partir de la cepa SA11-4F y de cantidades crecientes del oligonucleótido G5-3-C21. El primer carril de izquierda a derecha muestra un control de síntesis de la hebra negativa de los 11 segmentos provenientes de la cepa SA11-4F. El producto del gen 5 aparece señalado a la izquierda de la figura.

**Panel B:** Autorradiografía de un gel de poliacrilamida-Tris Glicina 12% donde fueron analizados los productos de las reacciones en las que "open cores" provenientes de la cepa de rotavirus SA11-4F fueron incubados en condiciones indicadas de replicación "in vitro", en presencia de [ $\alpha^{32}$ -P]UTP, de 200ng de los 11 mRNAs obtenidos a partir de la cepa DxRRV y de cantidades crecientes del oligonucleótido G5-3-C21. El primer carril de izquierda a derecha muestra un control de síntesis de la hebra negativa de los 11 segmentos provenientes de la cepa DxRRV. El producto del gen 5 aparece señalado a la derecha de la figura.

#### **4- Efecto del uso de oligonucleótidos G5 3'-C21 mutados sobre la síntesis de la hebra negativa del gen 5 de la cepa SA11-4F.**

Una vez observado que el oligonucleótido G5 3'-C21 utilizado en el ensayo anterior era capaz de inhibir completamente la síntesis de la hebra negativa del gen 5, fueron diseñados oligos similares al anterior pero en este caso se introdujeron cambios de 2 bases (Tabla 1). Como indica la tabla 1 los cambios en los oligos fueron hechos de manera que se dejó intacto el CCA del extremo 3'. En el experimento se utilizó "open cores" de la cepa DxRRV y mRNAs de la cepa SA11-4F. En la figura 10 se muestra (de izquierda a derecha) una replicación endógena, un control síntesis de hebra negativa de la cepa SA11-4F y síntesis de la hebra negativa de los 11 mRNAs en presencia de los diferentes oligos diseñados.

Al comparar el electroferotipo de la replicación endógena con el de la síntesis de hebra negativa (control), se observa la aparición de un nuevo patrón correspondiente a la cepa SA11-4F. En el caso del gen 5 de la cepa DxRRV aún se puede observar una replicación endógena residual (señalado en la figura 10). Cuando se utilizó el oligo C5 3'-C21, se confirmó un 100% de inhibición de la síntesis de la hebra negativa del gen 5 de la cepa SA11-4F. Con los oligos con sustituciones de bases se observa más de un 97% de inhibición. Los oligonucleótidos con sustituciones de bases solamente afectaron la síntesis de la hebra negativa del gen 5 de la cepa SA11-4F, conservándose la especificidad de la inhibición.



**Figura 10.** Efecto de oligonucleótidos antisentidos dirigidos contra las últimas 21 bases del extremo 3' del gen 5 sobre la síntesis de la hebra negativa de la cepa SA11-4F.

Autorradiografía de un gel de poliacrilamida-Tris Glicina 12% donde fueron analizados los productos de las reacciones en las que "open cores" provenientes de la cepa de rotavirus DxRRV fueron incubados en condiciones indicadas de replicación "in vitro", en presencia de  $[\alpha^{32}\text{-P}]\text{UTP}$ , de 200 ng de los 11 mRNAs obtenidos a partir de la cepa SA11-4F y de diferentes oligonucleótidos. El primer carril de izquierda a derecha muestra la replicación de los 11 segmentos provenientes de la cepa DxRRV. En el pie de la figura aparece el porcentaje de síntesis de la hebra negativa del gen 5 de la cepa SA11-4F. El 100% de replicación corresponde con la síntesis de la hebra negativa del gen 5 de la cepa SA11-4F en ausencia de oligonucleótidos. Los demás valores de porcentaje de replicación se calculan en proporción con el control.



**Tabla 1. Secuencias de los oligonucleótidos antisentidos dirigidos contra las últimas 21 bases del extremo 3'- del gen 5 que presentan cambios de dos bases respecto a G5 3'-C21.**

Cada oligonucleótido de la serie ES, presenta dos bases cambiadas respecto al oligonucleótido G5 3'-C21. Las base que confieren diferencia a los oligos de tipo ES respecto al G5 3'-C21 están dibujadas en rojo y escritas en minúsculas.

Nombre	Secuencia
G5 3'-C21	5' -GGTTCACAGTATTTTGCCAGC-3'
ES-1	5' -GGT <b>aa</b> ACAGTATTTTGCCAGC-3'
ES-2	5' -GGTT <b>at</b> CAGTATTTTGCCAGC-3'
ES-3	5' -GGTTC <b>ta</b> AGTATTTTGCCAGC-3'
ES-4	5' -GGTTC <b>at</b> GTATTTTGCCAGC-3'
ES-5	5' -GGTTCAC <b>ta</b> TATTTTGCCAGC-3'
ES-6	5' -GGTTCACA <b>aa</b> ATTTTGCCAGC-3'
ES-7	5' -GGTTCACAG <b>at</b> TTTTGCCAGC-3'
ES-8	5' -GGTTCACAGT <b>ta</b> TTTGCCAGC-3'

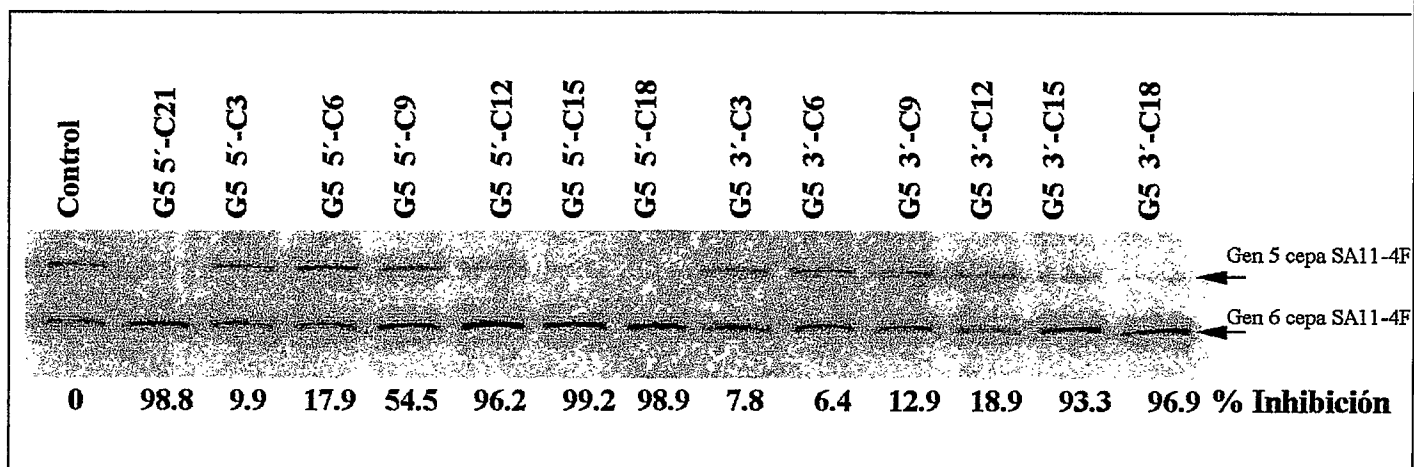


### **5- Análisis de la región formada por las últimas 21 bases del extremo 3' del gen 5 de la cepa SA11-4F en la síntesis de la hebra negativa de este gen.**

A partir del resultado anterior donde se estableció el efecto inhibitorio del oligo G5 3'-C21, se determinó cuáles de las 21 bases eran responsables de la inhibición. Para ello, se diseñaron nuevos oligos los cuales crecían en 3 bases en dirección 5' o 3' del oligo G5 3'-C21 (Tabla 2).

La figura 11 muestra el segmento del gel correspondiente a la síntesis de la hebra negativa de los genes 5 y 6 de la cepa SA11-4F utilizando "open core" de la cepa DxRRV. La cuantificación del porcentaje de replicación se normalizó con respecto al gen 6, tomando como 100% de replicación la señal del control sin oligonucleótido.

El oligo de 12 bases (G5 3'-C12) que deja libre 9 bases del extremo 3' del mRNA blanco inhibe la replicación en un 20%, sin embargo el oligo de 12 bases (G5 5'-C12) inhibe en un 97% (ver tabla 2). Esto nos sugiere que la zona importante de reconocimiento estaría hacia el extremo 3' de esta región. Por otra parte, si al oligo de 12 bases del extremo 5' se le adiciona 3 bases hacia el extremo 3' (G5 3'-C15), la inhibición aumenta de 20 a 94%. El oligo de 9 bases hacia el extremo 3' (G5 5'-C9) inhibe en un 50%, lo cual confirma los resultados obtenidos con el oligo de 12 bases del extremo 3' (G5 5'-C12).



**Figura 11.** Efecto de oligonucleótidos antisentidos antisentido de diferente número de bases dirigidos contra las últimas 21 bases del extremo 3'- del gen 5 sobre la síntesis de la hebra negativa de la cepa SA11-4F.

Fragmento de una autorradiografía de un gel de poliacrilamida-Tris Glicina 12% donde aparecen los genes 5 y 6 de los productos de las reacciones en las que "open cores" provenientes de la cepa de rotavirus DxRRV que fueron incubados en condiciones indicadas de replicación "in vitro", en presencia de  $[\alpha^{32}\text{-P}]\text{UTP}$ , de 200ng de los 11 mRNAs obtenido a partir de la cepa SA11-4F y de diferentes oligonucleótidos. En el pie de la figura aparece el porcentaje de síntesis de la hebra negativa del gen 5 de la cepa SA11-4F. El 0% inhibición corresponde con la síntesis de la hebra negativa del gen 5 de la cepa SA11-4F en ausencia de oligonucleótidos. Los demás valores de porcentaje de inhibición se calculan en proporción con el control.

**Tabla 2.** Secuencia de los oligonucleótidos antisentidos de diferente número de bases dirigidos contra las últimas 21 bases del extremo 3'- del gen 5 de la cepa SA11-4F.

En el extremo inferior de la tabla aparece en color rojo la secuencia del extremo 3'- del gen 5 de la cepa SA11-4F. Los oligos están distribuidos dentro de la tabla permitiendo determinar la zona del gen 5 que está siendo analizada. El porcentaje de replicación del gen 5 en presencia del oligonucleótido antisentido aparece en el extremo derecho de la tabla.

OLIGO	Secuencia	% de Inhibición
G5 5'-C3	5'-GGT-3'	9.5
G5 5'-C6	5'-GGTTCA-3'	17.9
G5 5'-C9	5'-GGTTCACAG-3'	55.5
G5 5'-C12	5'-GGTTCACAGTAT-3'	96.2
G5 5'-C15	5'-GGTTCACAGTATTTT-3'	99.2
G5 5'-C18	5'-GGTTCACAGTATTTTGCC-3'	98.9
G5 5'-C21	5'-GGTTCACAGTATTTTGCCAGC-3'	98.8
G5 3'-C3	5'-AGC-3'	7.8
G5 3'-C6	5'-GCCAGC-3'	6.4
G5 3'-C9	5'-TTTGCCAGC-3'	8.9
G5 3'-C12	5'-TATTTTGCCAGC-3'	18.9
G5 3'-C15	5'-CAGTATTTTGCCAGC-3'	93.3
G5 3'-C18	5'-TCACAGTATTTTGCCAGC-3'	96.9
G5 3'-C21	5'-GGTTCACAGTATTTTGCCAGC-3'	98.8
G5 mRNA	3'-CCAAGUGUCAUAAAACGGUCGAUCCGCGAUGAGAUCAGACCU-5' (extremo 3')	

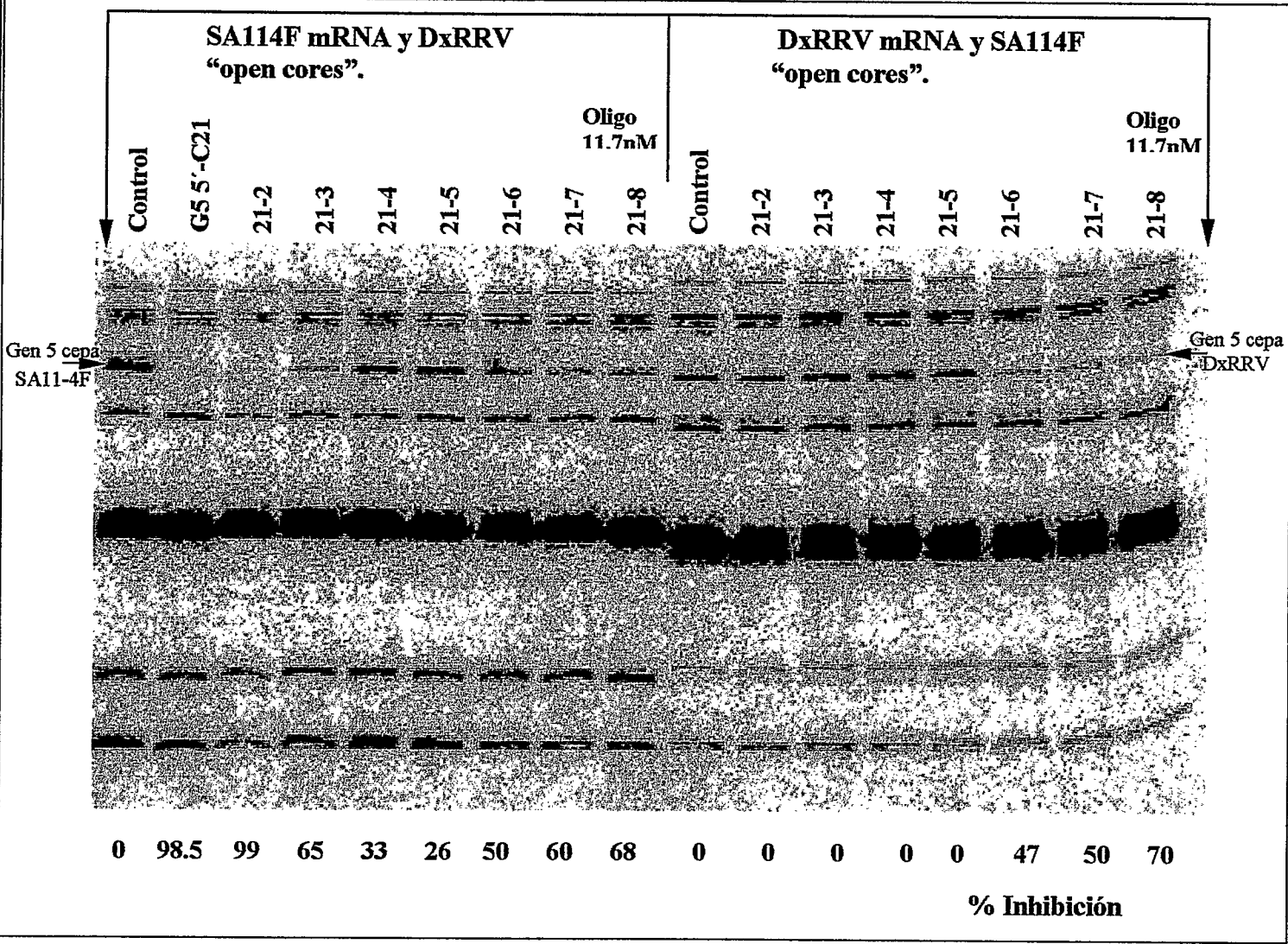
## **6- Búsqueda en el extremo 3' del mRNA del gen 5 de otras zonas importantes para la síntesis de la hebra negativa.**

Con el objetivo de estudiar la presencia de señales en la secuencia del 3'-UTR que se encuentran río arriba a la secuencia consenso del extremo, se utilizaron oligonucleótidos antisentidos de 21 bases donde cada uno estaba desplazado en 3 bases respecto al anterior, alejándose del extremo 3' (Tabla 3). En estos ensayos se utilizaron dos combinaciones de 'open core' y mRNA, los "open cores" de la cepa DxRRV con los mRNAs de la cepa SA11-4F y viceversa.

Durante la síntesis de la hebra negativa de la cepa SA11-4F, el oligo 21-2 produce un efecto inhibitorio sobre la síntesis del gen 5 similar al producido por el oligo G5 3'-C21. Por el contrario, el oligo 21-2 deja libre el CCA del extremo 3', lo cual indica que la presencia del CCA en forma de hebra simple es una señal necesaria pero no suficiente para la síntesis de la hebra negativa. Si el oligo deja libre las primeras 9 bases (21-4 y 21-5) se recupera la síntesis de hebra negativa. Esto nos confirma el resultado anterior donde las primeras 9 bases del extremo 3' son imprescindibles durante este evento. Las bases entre las posiciones 9 y 33 (21-4 y 21-5) aparentemente no tienen un papel importante en este proceso. Sin embargo las bases entre las posiciones 33 y 41 (21-4, 21-5 y 21-6) si parecen participar en la síntesis de la hebra negativa del gen 5 pues los oligos que hibridan sobre esta región inhiben hasta en un 70% (21-8) la síntesis de la hebra negativa (Figura 12).

Durante la síntesis de la hebra negativa de la cepa DxRRV, los oligos que comprenden las bases 1 a la 33 (G5 5'-C21) no inhiben la síntesis de la hebra negativa. En esta región

el mRNA DxRRV tiene 4 sustituciones de bases y una delección en comparación con la cepa SA11-4F. Sin embargo, en el ensayo 4 (Figura 10) los oligos con 2 sustituciones de bases eran inhibitorios, indicando que cambios superiores a 2 bases impiden el efecto inhibitorio de los oligos. Estos resultados indican que el sistema de replicación puede discriminar entre extremos 3' con diferencias en más de 2 bases. Los oligos 21-6 al 8 mostraron un efecto similar sobre la síntesis de hebra negativa del gen 5 de la cepa DxRRV, confirmando el papel de esta región durante la replicación.



**Figura 12.** Efecto de oligonucleótidos antisentidos desplazados unos respecto a otros en tres bases en dirección al 5' del gen 5 sobre la síntesis de la hebra negativa de las cepas SA11-4F y DxRRV.

Autorradiografía de un gel de poliacrilamida-Tris Glicina 12% donde fueron analizados los productos de las reacciones en las que 0.5µg de "open cores" provenientes de la cepa de rotavirus DxRRV o SA11-4F fueron incubados en condiciones indicadas de replicación "in vitro", en presencia de [ $\alpha^{32}$ -P]UTP, de 200ng de los 11 mRNAs obtenido a partir de la cepa SA11-4F o DxRRV y de diferentes oligonucleótidos. Ambos controles muestran la replicación de los 11 segmentos provenientes de las cepas SA11-4F (primer control de izquierda a derecha) y DxRRV respectivamente. En el pie de la figura aparece el porcentaje de inhibición de la síntesis de la hebra negativa del gen 5 de la cepa SA11-4F y DxRRV respectivamente. El 0% de inhibición corresponde con la síntesis de la hebra negativa del gen 5 de la cepa SA11-4F y DxRRV en ausencia de oligonucleótidos. Los demás valores de porcentaje de inhibición se calculan en proporción con el control que le corresponde.

**Tabla 3. Secuencia de los oligonucleótidos antisentidos desplazados unos respecto a otros en tres bases en dirección al 5' del gen 5 de la cepa SA11-4F.**

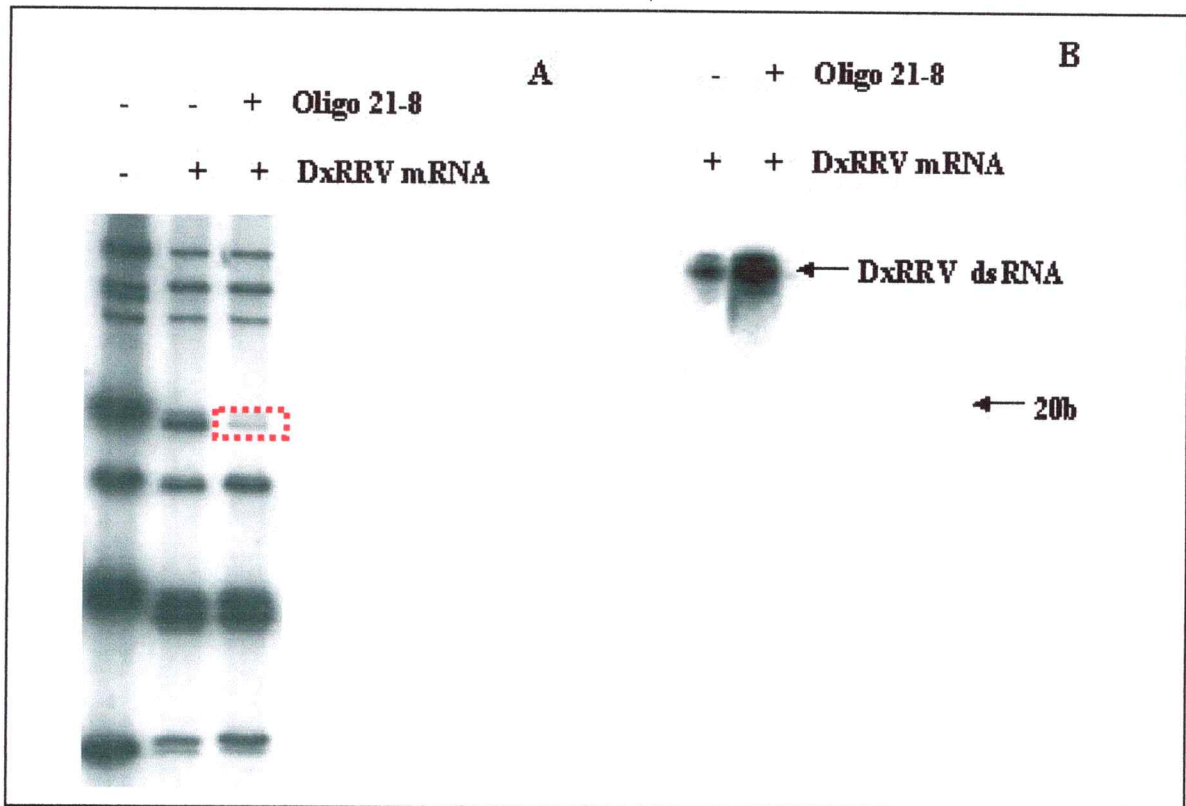
Cada oligonucleótido de la serie 21-n, esta desplazado en 3n bases respecto al oligonucleótido G5 3'-C21 en dirección al 5'- del gen 5. En el extremo inferior de la tabla aparece en color rojo la secuencia del extremo 3'- del gen 5 de la cepa SA11-4F. La secuencia en color verde corresponde al extremo 3'- del gen 5 de la cepa DxRRV. Los oligos están distribuidos dentro de la tabla permitiendo determinar la zona del gen 5 que esta siendo analizada. El porcentaje de replicación del gen 5 de cada cepa en presencia del oligonucleótido antisentido aparece en el extremo derecho de la tabla.

OLIGO	Secuencia	% de Inhibición	
		SA11-4F	DxRRV
21-8	5' -TAGGCGCTACTCTAGTCTGGA-3'	68	70
21-7	5' -AGCTAGGCGCTACTCTAGTCT-3'	60	50
21-6	5' -GCCAGCTAGGCGCTACTCTAG-3'	50	47
21-5	5' -TTTGCCAGCTAGGCGCTACTC-3'	26	0
21-4	5' -TATTTTGCCAGCTAGGCGCTA-3'	33	0
21-3	5' -CAGTATTTTGCCAGCTAGGCG-3'	92	0
21-2	5' -TCACAGTATTTTGCCAGCTAG-3'	99	0
G5 5'-C21	5' -GGTTCACAGTATTTTGCCAGC-3'	98.5	0
G5 mRNA	3' -CCAAGUGUCAUAAAACGGUCGAUCCGCGAUGAGAUCAAGACCU-5' (extremo 3' SA11-4F)		
G5 mRNA	3' -CCgAaUGUCA-AAAACGacCGAUCCGCGAUGAGAUCAgguCU-5' (extremo 3' DxRRV)		

## **7- Búsqueda de fragmentos abortivos de replicación durante la inhibición de síntesis de hebra negativa mediada por oligonucleótidos dirigidos contra el extremo 3' del gen 5.**

El efecto inhibitorio de los oligos sobre la región 33 a 41, podría deberse a que la polimerasa al encontrar el oligo aborta la extensión, evento anteriormente descrito para otros tipos de polimerasas. Otra posibilidad es que esta región esté involucrada en el proceso de reconocimiento y unión de la polimerasa, algo similar está descrito para hepadnavirus y retrovirus (Pappalardo y cols., 1998). Por ello, se propuso detectar la presencia de fragmentos abortivos durante este evento. Con este fin se utilizaron "open cores" de la cepa SA11-4F, mRNA DxRRV y el oligo 21-8 (Tabla 3). En el carril 3 del panel A de la figura 13 se muestra la inhibición de la síntesis del gen 5 debido a la presencia del oligo 21-8. En el panel B se observa la autorradiografía de un gel denaturante de poliacrilamida al 12% donde la ausencia de señal cercana a los 20 nucleótidos indica la no-formación de fragmentos abortivos. Así, esta región tendría algún papel en el evento de reconocimiento o inicio de la síntesis. Esta hipótesis también es apoyada por la evidencia de que la hibridación de oligonucleótidos en regiones mas alejadas del extremo 3', no producen ningún efecto inhibitorio (datos no mostrados). Por lo tanto, la elongación no parece estar afectada por el apareamiento de un oligo sobre la hebra del mRNA.





**Figura 13** Ausencia de productos abortivos de síntesis de hebra negativa ante la inhibición provocada por oligos dirigidos contra el extremo 3' del mRNA.

**Panel A:** Autorradiografía de un gel de poliacrilamida-Tris Glicina 12% donde fueron analizados los productos de las reacciones en las que “open cores” provenientes de la cepa de rotavirus SA11-4F fueron incubados en condiciones indicadas de replicación “*in vitro*”, en presencia de  $[\alpha^{32}\text{-P}]\text{UTP}$  y en presencia y ausencia de 200ng de los 11 mRNAs obtenidos a partir de la cepa DxrRV y de  $11.7\mu\text{M}$  de del oligonucleótido 21-8. La cuadrícula roja señala la inhibición de la síntesis del gen 5 de la cepa DxrRV debido a la presencia del oligonucleótido 21-8.

**Panel B:** Autorradiografía de un gel de poliacrilamida-Urea-TBE 12% donde fueron analizados los productos de las reacciones en las que “open cores” provenientes de la cepa de rotavirus SA11-4F fueron incubados en condiciones indicadas de replicación “*in vitro*”, en presencia de  $[\alpha^{32}\text{-P}]\text{UTP}$ , de 200ng de los 11 mRNAs obtenidos a partir de la cepa DxrRV y en presencia y ausencia de  $11.7\mu\text{M}$  de del oligonucleótido 21-8. Las señales observadas en la autorradiografía corresponden con los 11 dsRNAs productos de la síntesis de la hebra negativa. Mediante una flecha aparece señalado la posición que correspondería en el gel a un RNA de simple hebra de aproximadamente 20 bases de longitud. Para asegurarnos de la ausencia de fragmentos abortivos en el carril correspondiente a la reacción en presencia del oligonucleótido 21-8 se aplicaron 5 volúmenes de reacción. La exposición del gel se extendió en 10 veces el tiempo, sin que apareciera ninguna señal sobre las 20 bases (Dato no mostrado).

## **8- Análisis de las secuencias y estructuras de los extremos 3' de los mRNAs de Rotavirus.**

La capacidad del sistema de replicación de reconocer 11 segmentos diferentes ha llevado a pensar en la existencia de alguna secuencia consenso en el extremo 3' de las cadenas positivas del genoma de Rotavirus. La capacidad de los "open cores" de utilizar como molde para la síntesis de la hebra negativa a los 11 mRNAs mensajeros tanto de su propia cepa como de una cepa diferente, hace más difícil encontrar una secuencia conservada entre los 22 segmentos. En el recuadro superior de la figura 14 aparecen alineados según CLUSTAL W (1.8) los últimos 75 nucleótidos del extremo 3' de 6 genes diferentes de la cepa SA11-4F y se puede observar que el ACC está 100% conservado (Figura 14 panel A). En los restantes 73 nucleótidos solo aparecen dos bases conservadas. Estos resultados nos hicieron pensar en que quizás el sistema de replicación en lugar de reconocer una secuencia específica estaría reconociendo una estructura como ocurre con otras polimerasas virales y reverso transcriptasas (Yu y cols., 2000; Pappalardo y cols., 1998, Harrich y cols, 2000). Para la búsqueda de una estructura conservada se utilizó el programa de predicción de estructura secundaria Mfold desarrollado por Zuker y cols. (Zuker, 1989; Zuker, 1994). En el análisis los 11 segmentos completos de la cepa SA11-4F no se encontró una estructura conservada en el extremo 3'. Esto podría deberse a limitaciones del programa pues el mismo ha sido desarrollado a partir de modelos de 75 a 100 nucleótidos y nuestros mRNAs tienen tallas superiores a 600 nucleótidos. Además Mfold calcula la estructura de menor energía libre de Gibbs y esta aproximación termodinámica está comenzando a ser sustituida por un modelaje dinámico en el cual prevalecen estructuras de energías intermedias (Tinoco Jr

y Bustamante, 1999). El modelaje dinámico se fundamenta en que los RNAs se estructuran a medida que se sintetizan (Wuju y Jianjin, 1998; Tinoco Jr y Bustamante, 1999). Estructuras como los sitios internos de unión de ribosomas (IRES) presentes en flavivirus y picornavirus han demostrado no perder su función al ser utilizadas en el contexto de otro RNA (Palmenberg y Sgro, 1997). Una característica de estos dominios es su localización en los extremos de los RNAs y un tamaño entre los 75 y 100 nucleótidos. Basándonos en estos preceptos las estructuras de los extremos 3' de los mRNAs fueron analizadas nuevamente. En lugar de modelar la estructura de los segmentos completos fueron analizadas las últimas 75 y 100 bases del extremo 3' de cada uno de los 11 mRNAs de la cepa SA11-4F. Los modelos obtenidos fueron comparados buscando alguna estructura común. El análisis muestra tres conclusiones:

- 1- Los últimos 6 nucleótidos del extremo 3' quedan libres y no participan de ninguna estructura secundaria.
- 2- Cercano al extremo 3' (12 a 19 bases) todos los genes mostraban la presencia de una estructura de tallo y horquilla.
- 3- Tanto las estructuras de tallo y horquilla como el extremo libre eran propiedades conservadas para los análisis realizados utilizando 75 y 100 bases del extremo.

El modelo de la estructura de tallo y horquilla obtenida para el extremo 3' del gen 5 de la cepa SA11-4F se muestra en la figura 14 panel B a continuación. Este modelo resulta comparativamente similar al descrito para el tallo y horquilla del extremo 5' del RNA genómico del virus de la diarrea bovina (Yu y cols., 2000), resultando similares las energías de Gibbs calculadas.

Esta aproximación estructural nos parece mucho más lógica pues es común encontrar proteínas que reconocen algún tipo de estructura durante su interacción con el RNA (Singer, 1995). Por otra parte una proteína secuencia específica era difícil de imaginar sobre todo al confirmar que un "open core" podía usar con igual eficiencia los mRNAs de otra cepa. Una pregunta aún por resolver era si acaso las diferencias encontradas entre los extremos de los genes 5 de las cepas SA11-4F y DxRRV afectaban nuestro modelo de estructura. Los dos cambios en las bases 19 y 20 las cuáles se encuentran en la base de la estructura del tallo podrían modificar la misma. Sin embargo, estos dos cambios están compensados por los que aparecen en las bases 40 y 41. De esta manera, estas 4 sustituciones de bases se compensan y mantienen la estructura. En la figura 15 panel A que aparece a continuación se han señalado a las 4 bases que participan en el evento compensatorio.

Basado en este modelo para la estructura del extremo 3' del mRNA del gen 5 la figura 15 panel B (arriba) muestra las diferentes zonas cubiertas por los oligos de 21 bases utilizados en el ensayo de inhibición del resultado 6. Estas zonas han sido señaladas en rojo y los porcentajes que aparecen corresponden a porcentaje inhibición. El recuadro I del panel B figura 15 muestra que cuando el oligo comienza a hibridar sobre el lazo y la zona 5' del tallo la inhibición aumenta de manera marcada. Este resultado apunta que quizás esta área del tallo es importante para el reconocimiento del mRNA por el sistema de replicación.

**A**

CLUSTAL W (1.8) multiple sequence alignment

```

VP4      ---ATCCTATAA-TTAGAAA--TAGAATTGAACAAC-TGAT-TATGCAATGCA--GGTTG 50
gen2     TTATGCTGTTG-CTTTTGA--TATAT-GCGCATCATGA---ACGAACTGTA--AACGC 51
gen11    -CAATGCAATTG-ATTGAAGATTTGTAA-GTCTGACCTGGG-AACACACTAGG--GAGCT 54
gen1     --AAAATTATGG-AAGAAGATGTGGAACATCACGTCATTACGTTCCGCCGTACACTAACGC 57
gen5     CTAATTATACAGTATTTAGGCATCAGAA-GACCGTC-----CAGACTAGAGTAGCGC 51
gen6     -----TCTGTAA--GTAAGGATGCGTAT-ACGCATT-CGC--TACACAGAGTATCACTC 49

```

\*

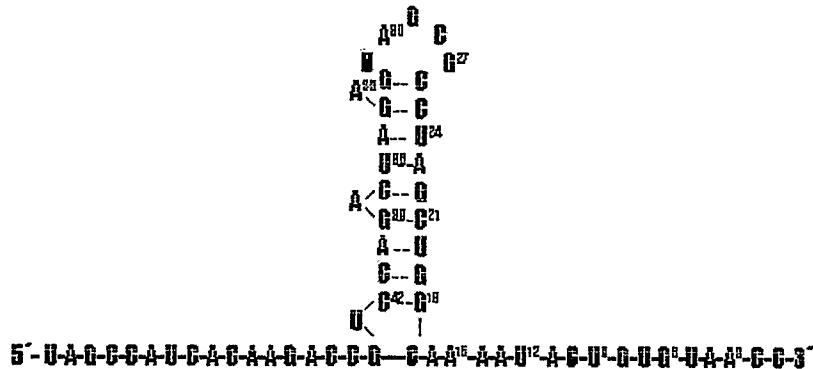
```

VP4      TGAGTAATTTCT-AGAGGAT-GTG-ACC 75
gen2     CAACCCCTTGT-GGAG-AT-ATG-ACC 75
gen11    C---CCGACTCC-AGTT-AT-GTG-ACC 75
gen1     GAACCTCTTTCA-AG--A-----ACC 75
gen5     C---TAGCTGGC-AAAATACTGTGAACC 75
gen6     TGATGGTATAGTGAGAGGAT-GTC-ACC 75

```

\*

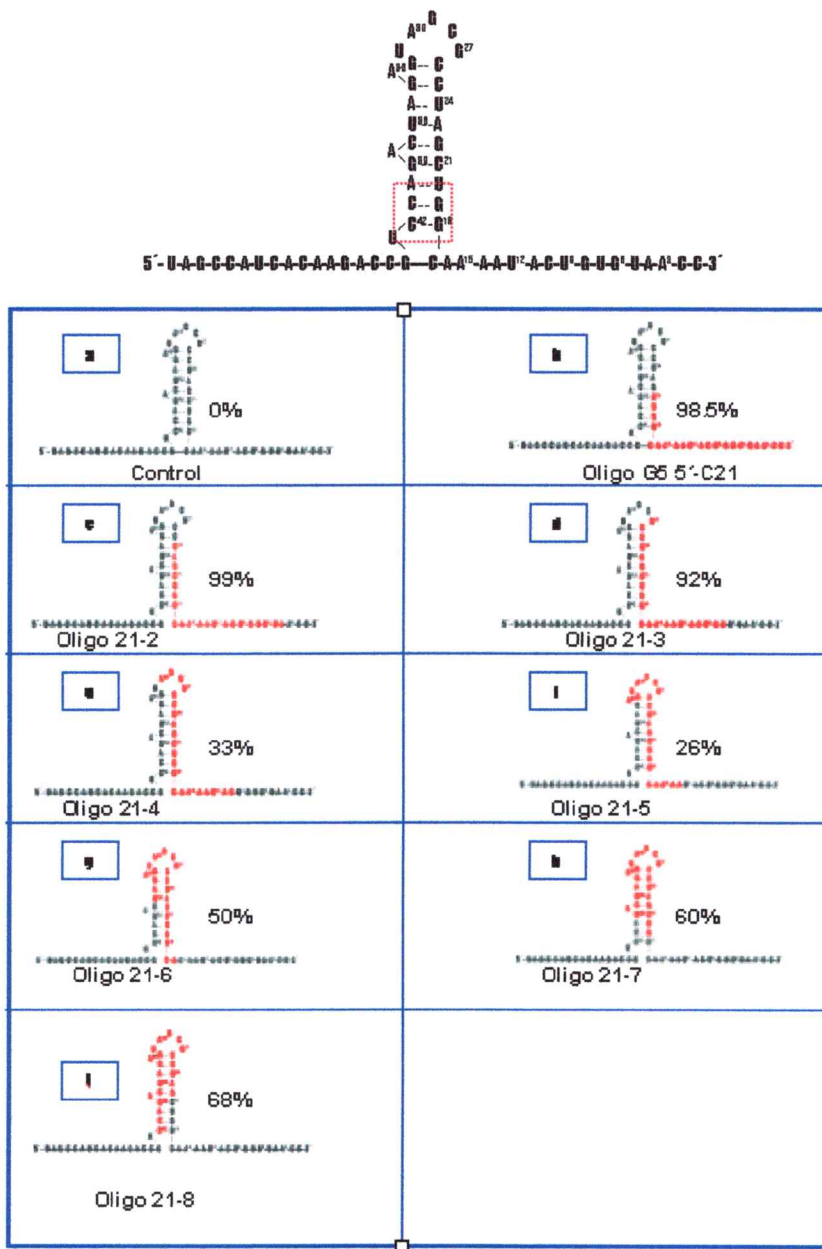
\*\*\*

**B**

**Figura 14.** Alineamiento de las secuencias de las últimas 75 bases de 6 diferentes mRNAs de la cepa SA11-4F. Modelo de la estructura secundaria del extremo 3' del gen 5.

Panel A: Alineamiento de las secuencias correspondiente a los 75 nucleótidos de extremo 3'- de los genes 4, 2, 11, 1, 5 y 6 de la cepa SA11-4F. Los asteriscos señalan las bases conservadas.

Panel B: Estructura de tallo y horquilla propuesta para el extremo 3'- del gen 5 de la cepa SA11-4F.



**Figura 15.** Análisis de las secuencias y estructuras secundarias de los extremos 3' de los mRNAs de Rotavirus.

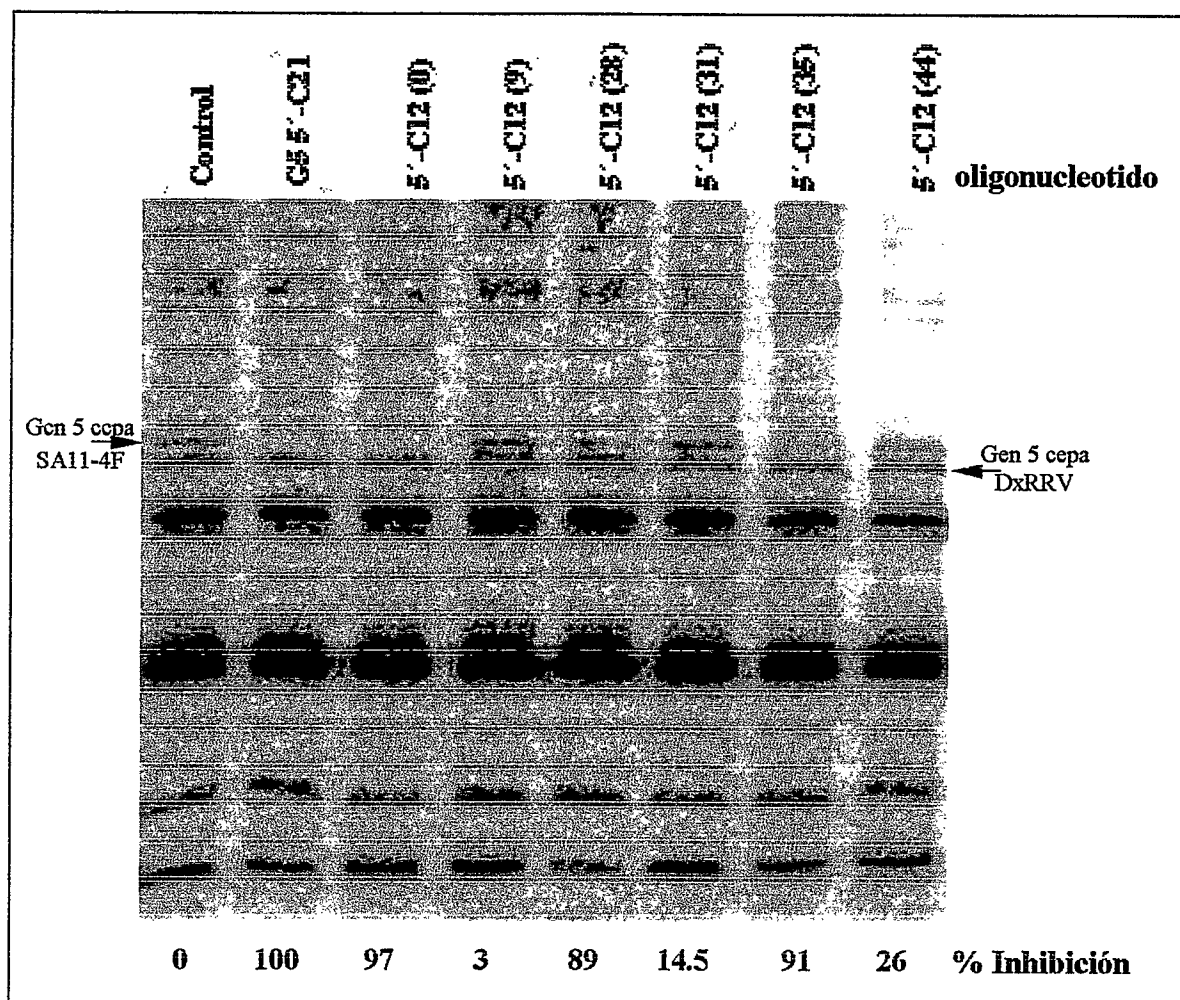
**Panel A:** Estructura de tallo y horquilla propuesta para el extremo 3' del gen 5 de la cepa SA11-4F. La cuadrícula roja señala las cuatro bases que pertenecen al tallo y que están cambiadas en la cepa DxRRV. Las sustituciones de bases de DxRRV conservan la estructura del tallo.

**Panel B:** Esquematación de la estructura de tallo y horquilla del extremo 3' del gen 5 de la cepa SA11-4F. Se coloreó en rojo las bases cubiertas por los oligonucleótidos utilizados en el ensayo de la figura 12. En este caso el porcentaje de inhibición que produce cada oligo está colocado en cada recuadro. El porcentaje de inhibición se calculó como 100% menos el porcentaje de replicación señalado en la tabla 3.

**9- Estudio del efecto sobre la síntesis de la hebra negativa de oligonucleótidos antisentidos dirigidos contra la región de posible estructura de tallo y horquilla del gen 5 de la cepa SA11-4F.**

Con el precedente del análisis anterior fue diseñado un grupo de cuatro oligos de 12 bases dirigidos contra diferentes regiones de la zona 5' de la estructura de tallo y horquilla presente en el extremo 3' de la cadena positiva del gen 5. Los oligos fueron nombrados 5'-C12 (N) y N corresponde al nucleótido del extremo 3' donde comienza a hibridar el extremo 5' del oligo. Los oligos 5'-C12(0) y 5'-C12(9) son idénticos al G5 5'-C12 y al G5 3'-C12 respectivamente (ver Tabla 2). En este ensayo fueron empleados "open core" de DxRRV y mRNA de SA11-4F. En la figura 16 el control corresponde a la reacción de síntesis de hebra negativa en ausencia de oligos. El gen 5 de la cepa SA11-4F aparece señalado. Como control de inhibición se usó el oligo C5 3'-C21. Los oligos 5'- C12 (28) y 5'- C12 (35), que hibridan sobre el lado 5' de la estructura tallo y horquilla, inhibieron de manera específica la síntesis de la hebra negativa del gen 5 (Figuras 16 y 17). Sin embargo, el oligo 5'-C12 (31) no inhibe eficientemente lo cual indica que la base del tallo y la horquilla son importantes para la síntesis de la hebra negativa. Como se observa en la figura 16, el oligo 5'- C12 (44) no inhibió considerablemente el evento de síntesis. Esta observación en conjunto con ensayos donde oligos más alejados de la estructura no inhibieron, demuestra el papel de la estructura tallo-horquilla en la síntesis de hebra negativa.

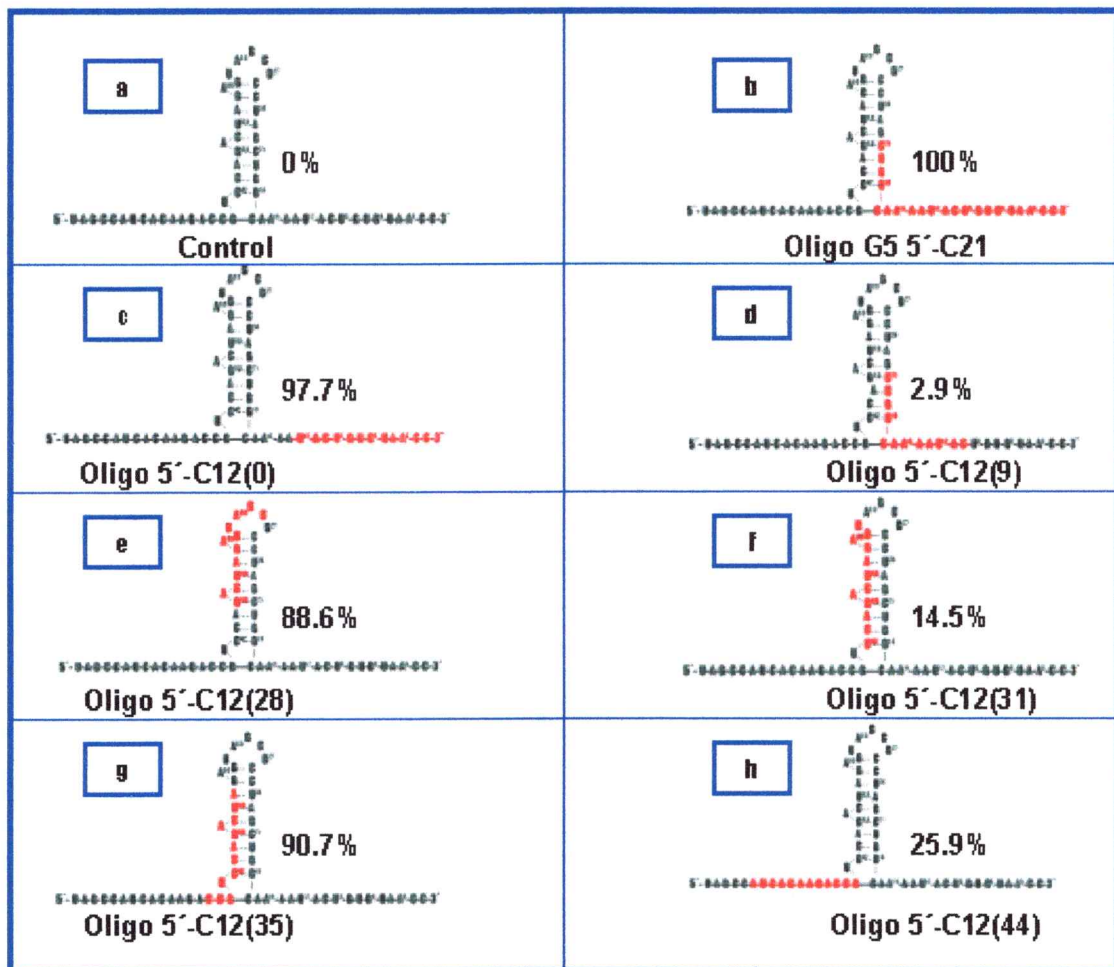




**Figura 16.** Oligonucleótidos antisentidos dirigidos contra las regiones entre las bases 28-40 y 35-47 afectan la síntesis de la hebra negativa del gen 5 de la cepa SA11-4F.

Autorradiografía de un gel de poliacrilamida-Tris Glicina 12% donde fueron analizados los productos de las reacciones en las que 0.5µg de "open cores" provenientes de la cepa de rotavirus DxRRV fueron incubados en condiciones indicadas de replicación "in vitro", en presencia de [ $\alpha^{32}$ -P]UTP, de 200ng de los 11 mRNAs obtenidos a partir de la cepa SA11-4F y 11.7µM de diferentes oligonucleótidos. El control muestra la replicación de los 11 segmentos provenientes de las cepas SA11-4F y además se puede observar una replicación endógena residual. En el pie de la figura aparece el porcentaje de inhibición de la hebra negativa del gen 5 de la cepa SA11-4F. El 0% de inhibición corresponde con la síntesis de la hebra negativa del gen 5 de la cepa SA11-4F en ausencia de oligonucleótidos antisentidos. Los demás valores de porcentaje de inhibición se calculan en proporción con el control.





**Figura 17.** Oligonucleótidos antisentidos dirigidos contra las regiones entre las bases 28-40 y 35-47 afectan la síntesis de la hebra negativa del gen 5 de la cepa SA11-4F.

Esquematación de la estructura de tallo y horquilla del extremo 3' - del gen 5 de la cepa SA11-4F. Se coloreó en rojo las bases cubiertas por los oligonucleótidos utilizados en el ensayo de la figura 16. En este caso el porcentaje de inhibición que produce cada oligo está colocado en cada recuadro. El porcentaje de inhibición se calculó como 100% menos el porcentaje de replicación señalado en la figura 16.

## **10- Efecto del tRNA sobre la replicación endógena y sobre la síntesis de hebra negativa utilizando a los 11 mRNAs virales como molde.**

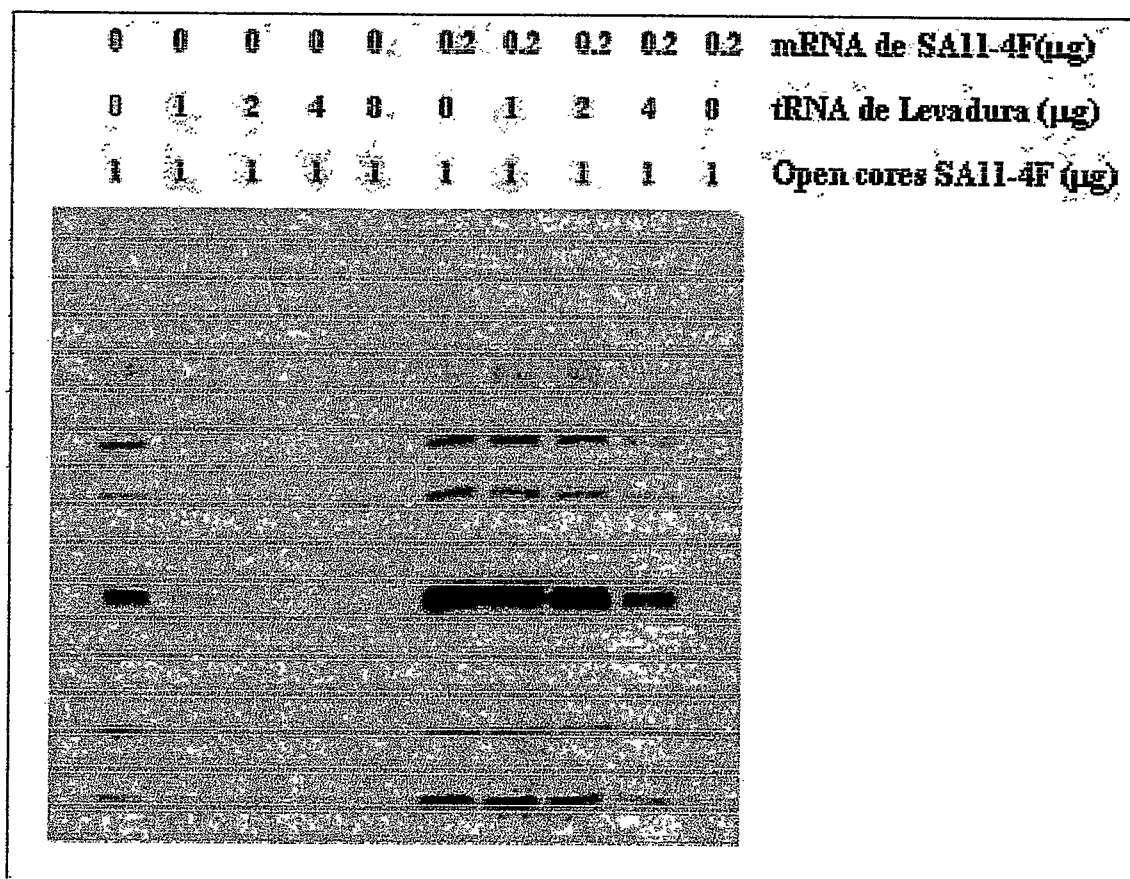
Teniendo en cuenta los resultados y análisis anteriores acerca del papel de las estructuras de tallo y horquilla en la síntesis de la hebra negativa del genoma del rotavirus, evaluamos el efecto de RNAs con estructuras secundarias de este tipo sobre la replicación endógena o la síntesis de hebra negativa. Los tRNAs son moléculas bien caracterizadas que comparten una estructura común (Quigley y cols., 1978). Esta estructura conocida como hoja de trébol contiene tres tallos y horquillas, y una secuencia CCA en su extremo 3'. Para estudiar este fenómeno fueron añadidos cantidades crecientes de tRNA total de levadura a una replicación endógena de la cepa SA11-4F y a una síntesis de hebra negativa con mRNA total de la misma cepa.

En la figura 18 se observa la desaparición de la replicación endógena de manera dependiente a la cantidad de tRNA añadida, lo cual aparece cuantificado en la figura 19.

El uso de dsRNA endógeno carente de estructura secundaria, es bloqueado por el tRNA.

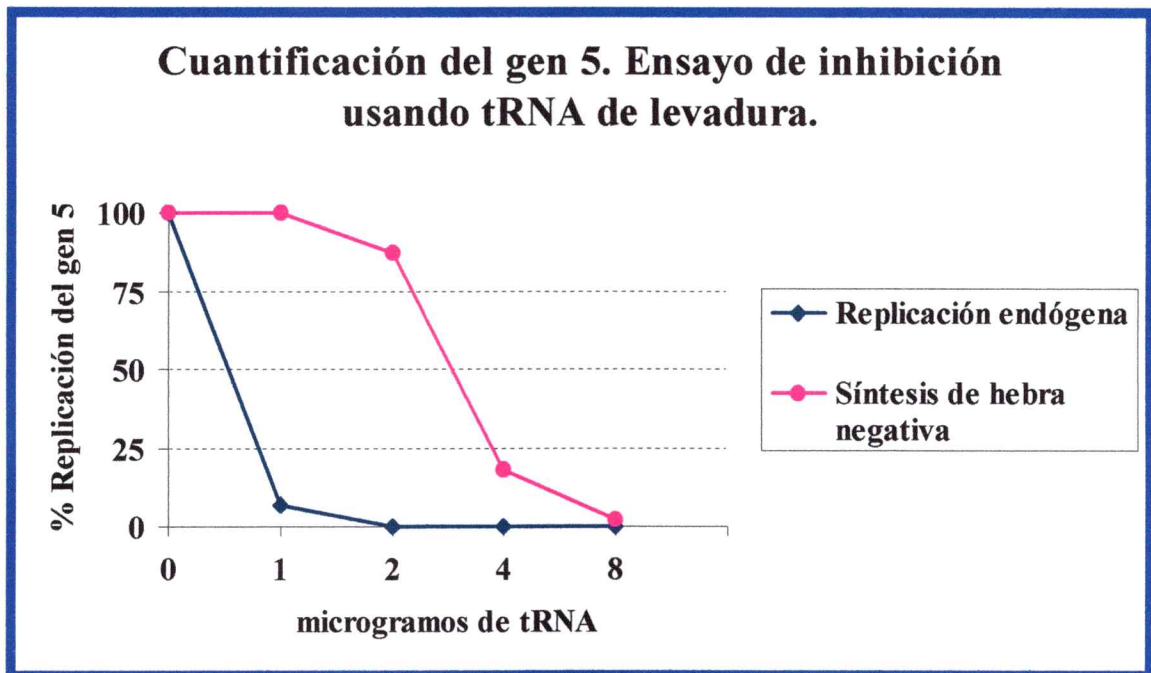
El efecto inhibitorio del tRNA sobre la síntesis de la hebra negativa es mucho menor (Figura 18). Concentraciones de tRNA 100 veces superior a la de mRNA no producen un efecto inhibitorio en la síntesis de la hebra negativa (Figura 19).

Resultados similares se obtuvieron utilizando mRNA de la cepa DxRRV, lo cual demuestra que el menor efecto inhibitorio del mRNA sobre la síntesis de hebra negativa no se debe a una recuperación de la replicación endógena.



**Figura 18.** Efecto del tRNA sobre la replicación endógena y sobre la síntesis de hebra negativa utilizando al mRNA como molde.

Autorradiografía de un gel de poliacrilamida-Tris Glicina 12% donde fueron analizados los productos de las reacciones en las que 0.5 μg de "open cores" provenientes de la cepa de rotavirus SA11-4F fueron incubados en condiciones indicadas de replicación "in vitro", en presencia de  $[\alpha^{32}\text{-P}]\text{UTP}$ , en presencia y ausencia de 200ng de mRNA total obtenido a partir de la cepa SA11-4F y en cantidades crecientes de tRNA total de levadura.



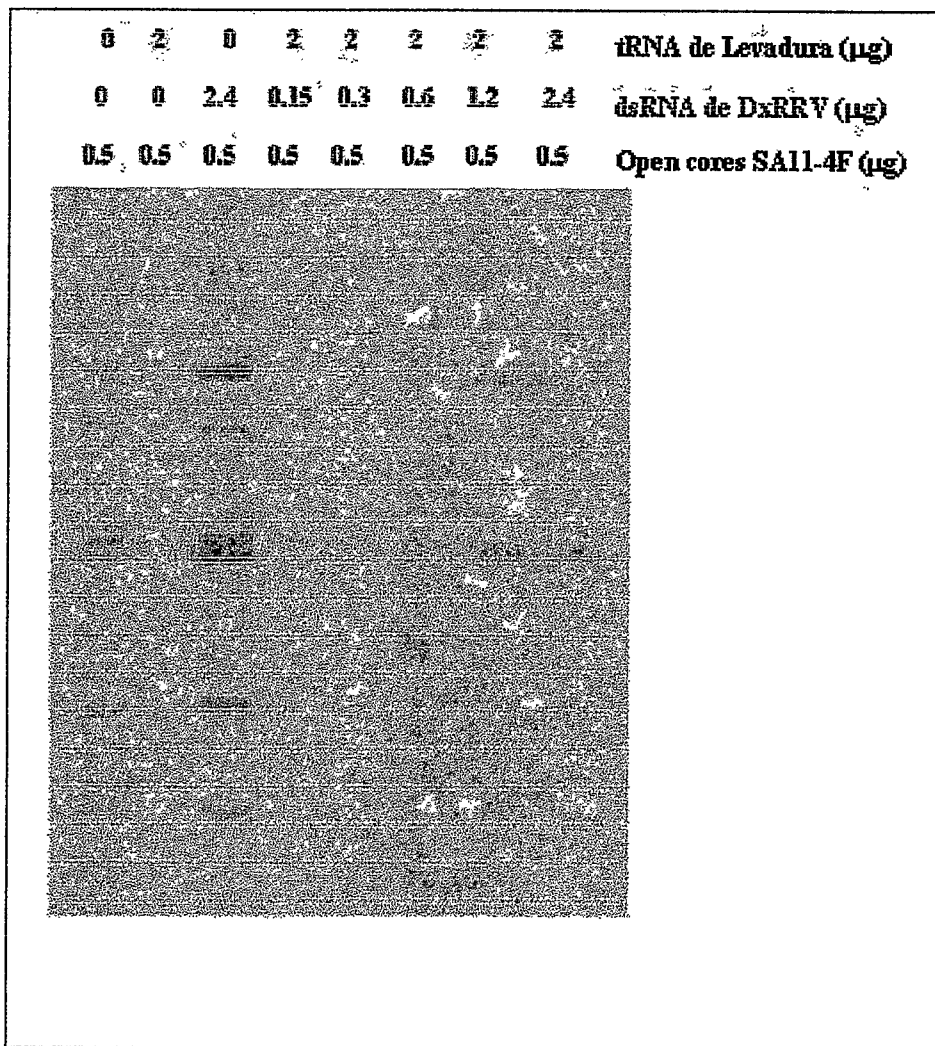
**Figura 19.** Cuantificación del producto relativo del gen 5 del producto de la replicación endógena de los “open cores” de las cepas SA11-4F y de la síntesis la hebra negativa del mRNA del gen 5 de la misma cepa en presencia de diferentes cantidades de tRNA.

La banda correspondiente al gen 5 de cada ensayo fue cuantificada y graficados los resultados. El eje de las abscisas contiene el porcentaje de replicación donde el 100% corresponde al ensayo en ausencia de tRNA de levadura., Cada valor del eje horizontal corresponde con las cantidades de tRNA añadidas a cada ensayo.

### **11- Efecto de la adición de tRNA de levadura sobre el uso de dsRNA exógeno por los “open cores” virales.**

El efecto inhibitorio del tRNA cuando el dsRNA es usado como molde en la replicación puede verificarse utilizando “open cores” de la cepa SA11-4F a los cuales se le añadieron cantidades crecientes de dsRNA de la cepa DxRRV de manera exógena.

En la figura 20 se muestra el control de replicación endógena en ausencia y presencia de dsRNA exógeno y un control de 100% de inhibición de replicación endógena en presencia de 2  $\mu$ g de tRNA. Como se observa al añadir cantidades crecientes de dsRNA exógeno, se mantiene el efecto inhibitorio del tRNA sobre la replicación. Esto confirma que a pesar de la capacidad del sistema de utilizar dsRNA como molde en la replicación, la presencia de una estructura de tallo-horquilla inhibe este evento. En comparación con el experimento anterior se han usado concentraciones 10 veces superiores de dsRNA respecto al mRNA.



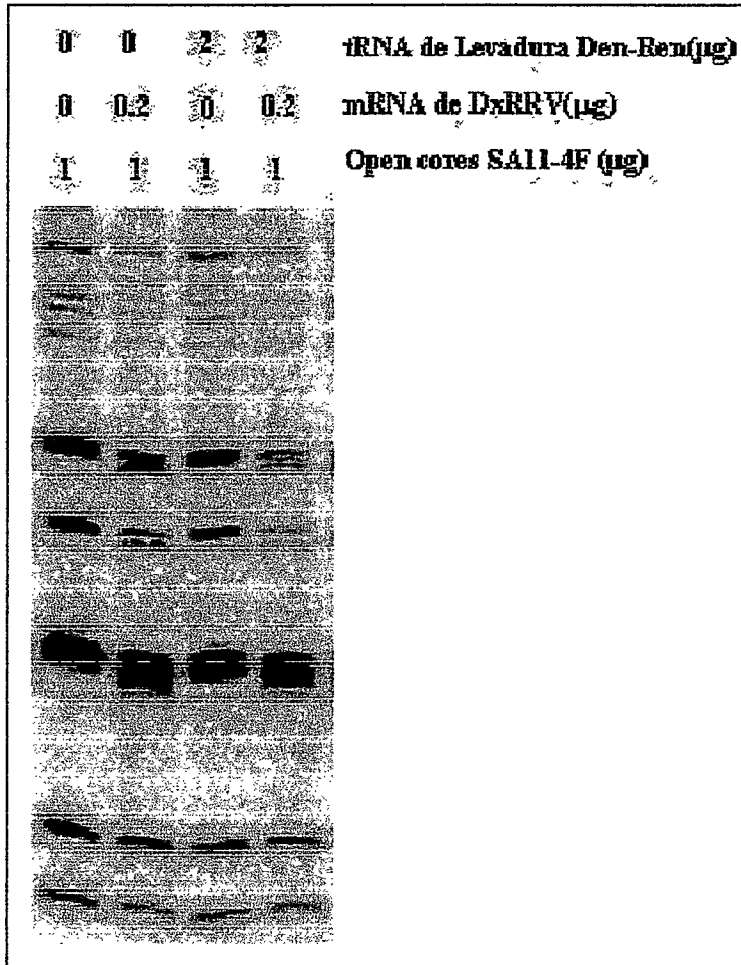
**Figura 20.** Efecto de la adición de tRNA de levadura sobre el uso de dsRNA exógeno por los “open cores” virales.

Autorradiografía de un gel de poliacrilamida-Tris Glicina 12% donde fueron analizados los productos de las reacciones en las que 0.5μg de “open cores” provenientes de la cepa de rotavirus SA11-4F fueron incubados en condiciones indicadas de replicación “*in vitro*”, en presencia de [ $\alpha^{32}$ -P]UTP, en cantidades crecientes de los 11 dsRNAs genómicos obtenidos a partir de la cepa DxRRV y en ausencia y presencia de 2μg de tRNA total de levadura.

## **12- Estudio del efecto de la estructura secundaria del tRNA sobre el uso del dsRNA como molde para la replicación.**

Los resultados obtenidos hasta el momento sugieren que la estructura del tRNA es la responsable de la inhibición observada sobre la replicación endógena. Por lo tanto, se decidió afectar la estructura del tRNA mediante un proceso de calentamiento a 95°C seguido de un enfriamiento lento hasta 32°C. Este enfriamiento lento promueve la interacción intermolecular sobre la intramolecular dificultando así el plegamiento correcto del tRNA.

Se evaluó el efecto del tRNA denaturado-renaturado sobre la replicación endógena y la síntesis de hebra negativa. En la figura 21 son se observan diferencias entre las reacciones control y en presencia de tRNA, indicándonos que el RNA luego del tratamiento pierde su efecto inhibitorio sobre la replicación endógena.



**Figura 21.** La estructura secundaria del tRNA es responsable de su efecto inhibitorio sobre el uso del dsRNA como molde para la replicación.

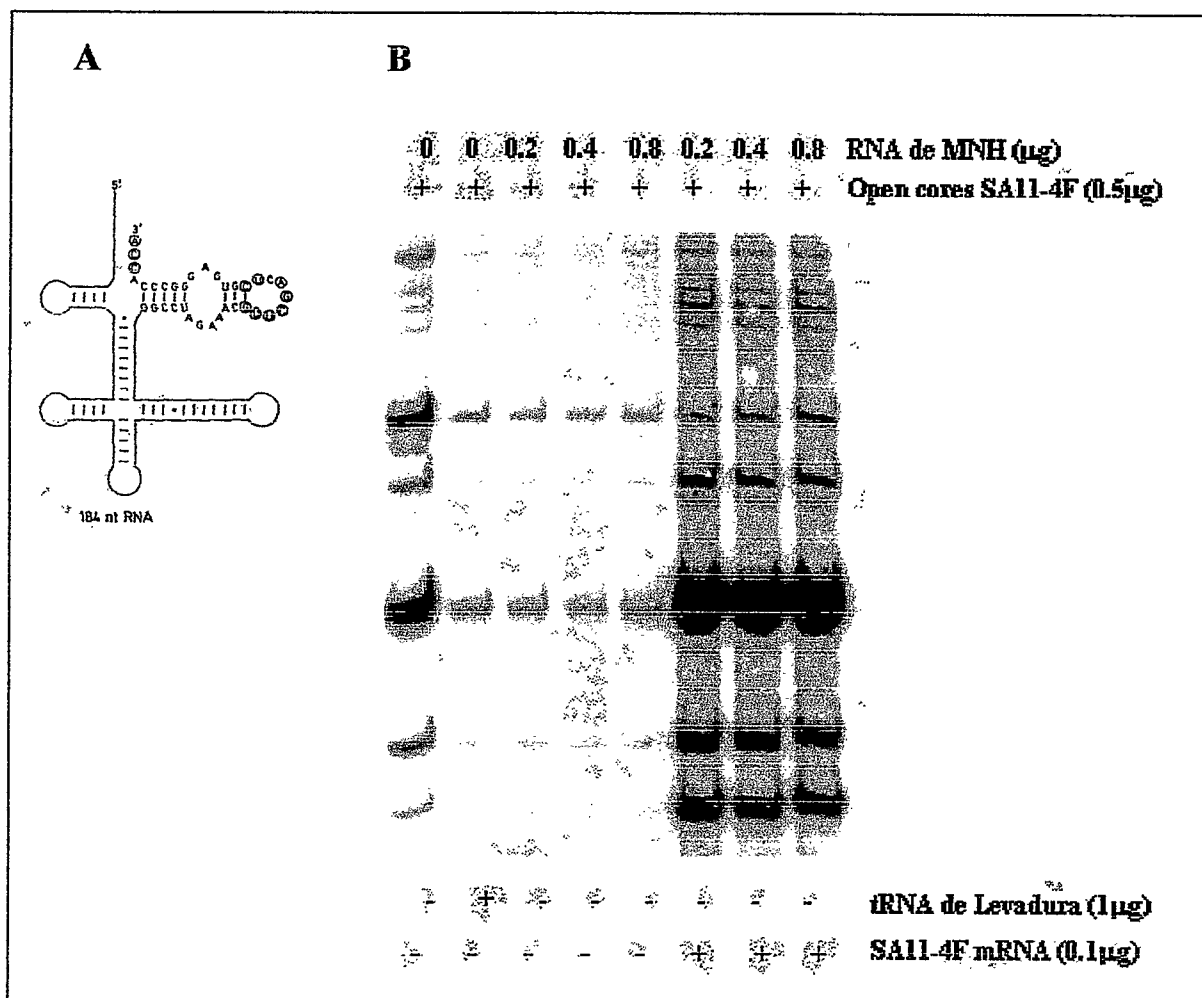
Autorradiografía de un gel de poliacrilamida-Tris Glicina 12% donde fueron analizados los productos de las reacciones en las que 1 $\mu$ g de "open cores" provenientes de la cepa de rotavirus SA11-4F fueron incubados en condiciones indicadas de replicación "in vitro", en presencia de [ $\alpha^{32}$ -P]UTP, en presencia y ausencia de 200ng de mRNAs totales de la cepa SA11-4F y de 2 $\mu$ g de tRNA de levadura sometidos a un tratamiento de denaturalización por calor a 95°C durante 5 minutos seguido de una renaturalización lenta (5 °C/min.) hasta llegar a 32°C donde fue añadido a la reacción de replicación.



### **13- Efecto del Mauriceville RNA (MNH) sobre el uso del dsRNA como molde para la replicación.**

Los resultados descritos en los ensayos anteriores sugieren el reconocimiento por la RNA polimerasa-RNA dependiente de Rotavirus de señales estructurales similares a las descritas para otras polimerasa RNA dependientes (Weiner y Maizels, 1987; Harrich y cols, 2000; Yu y cols. 2000). La reverso transcriptasa codificada por el plasmidio mitocondrial Mauriceville de *Neurospora crassa*, constituye un ejemplo de polimerasa con estas características. Esta reverso transcriptasa reconoce en su RNA molde una estructura de tallo y horquilla en su extremo 3', siendo el reconocimiento de esta estructura imprescindible para su uso como molde (Wang y cols., 1992). Teniendo en cuenta estos antecedentes se estudió si el sistema de "open core" podía afectarse en presencia del RNA Mauriceville al igual que ocurrió con el tRNA de levadura. Con este fin se sintetizaron *in vitro* los últimos 183 nucleótidos del RNA Mauriceville, los cuales participan en la formación de la estructura de reconocimiento de la reverso transcriptasa (Figura 22 panel A).

Como se observa el RNA Mauriceville inhibe la replicación endógena de manera similar al tRNA, pero al igual que el tRNA, este no inhibe la síntesis de hebra negativa (Figura 22 panel B). Sin embargo, se obtuvo igual grado de inhibición sobre la replicación endógena con cantidades 10 veces menores de RNA Mauriceville en comparación con tRNA (Figura 22 panel B). Por otro lado, el RNA Mauriceville no constituye un molde del sistema de replicación pues no se detectó síntesis de hebra negativa.



**Figura 22. El Mauriceville RNA tiene un efecto inhibitorio similar al tRNA sobre el uso del dsRNA como molde para la replicación.**

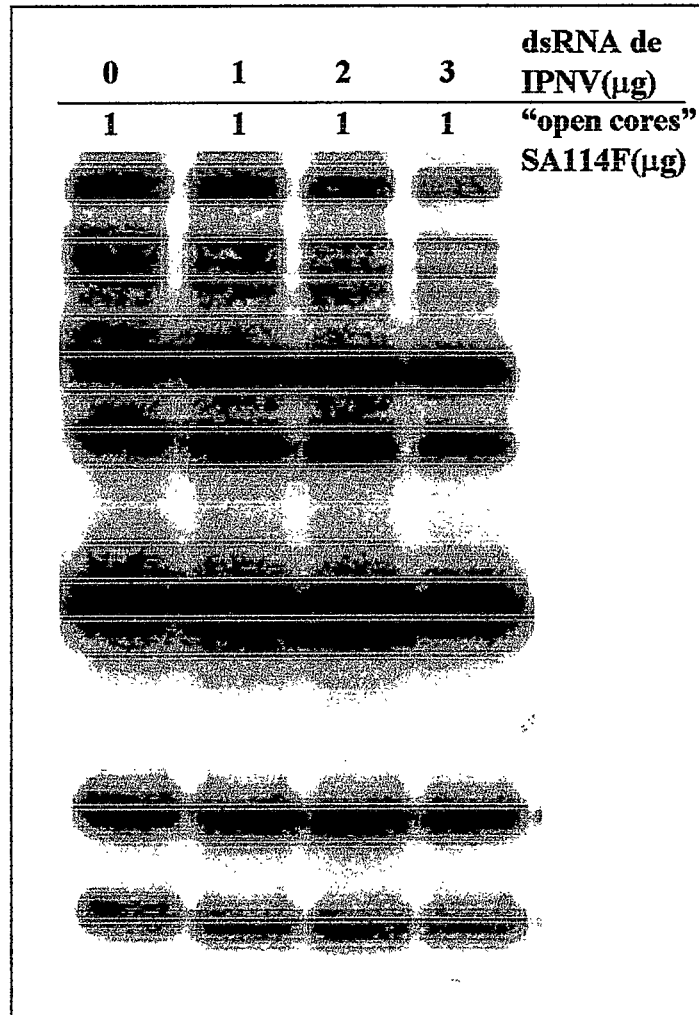
**Panel A:** Estructura secundaria propuesta para el extremo 3'-del Mauriceville RNA plasmidial (184 bases).

**Panel B:** Autorradiografía de un gel de poliacrilamida-Tris Glicina 12% donde fueron analizados los productos de las reacciones en las que 0.5µg de "open cores" provenientes de la cepa de rotavirus SA11-4F fueron incubados en condiciones indicadas de replicación "in vitro", en presencia de  $[\alpha^{32}\text{-P}]\text{UTP}$ , en presencia y ausencia de 100ng de los 11 mRNAs obtenidos a partir de la cepa SA11-4F y de cantidades crecientes de Mauriceville RNA (MNH). Los dos primeros carriles de izquierda a derecha son controles de replicación endógena en presencia y ausencia de 1µg de tRNA de total de levadura.

#### **14- Estudio de la adición de un dsRNA heterólogo sobre la replicación endógena de los “open cores”.**

De los ensayos anteriores se ha observado como la replicación endógena puede ser inhibida por la presencia de RNAs con estructura secundaria de tallo y horquilla. Si este evento inhibitorio es dependiente de la presencia de la estructura de tallo y horquilla, un posible control negativo constituiría un RNA de doble hebra carente de dicha estructura. Con este fin se empleó un dsRNA proveniente del Virus de la Necrosis Pancreática (IPNV). Este virus pertenece a la familia Birnaviridae y su genoma es un dsRNA segmentado.

La figura 23 muestra que el dsRNA del IPNV no inhibe la replicación endógena en ninguna de las concentraciones ensayadas. No se obtuvo evidencias del uso del dsRNA de IPNV como molde, lo cual demuestra la especificidad del sistema por dsRNA de Rotavirus.



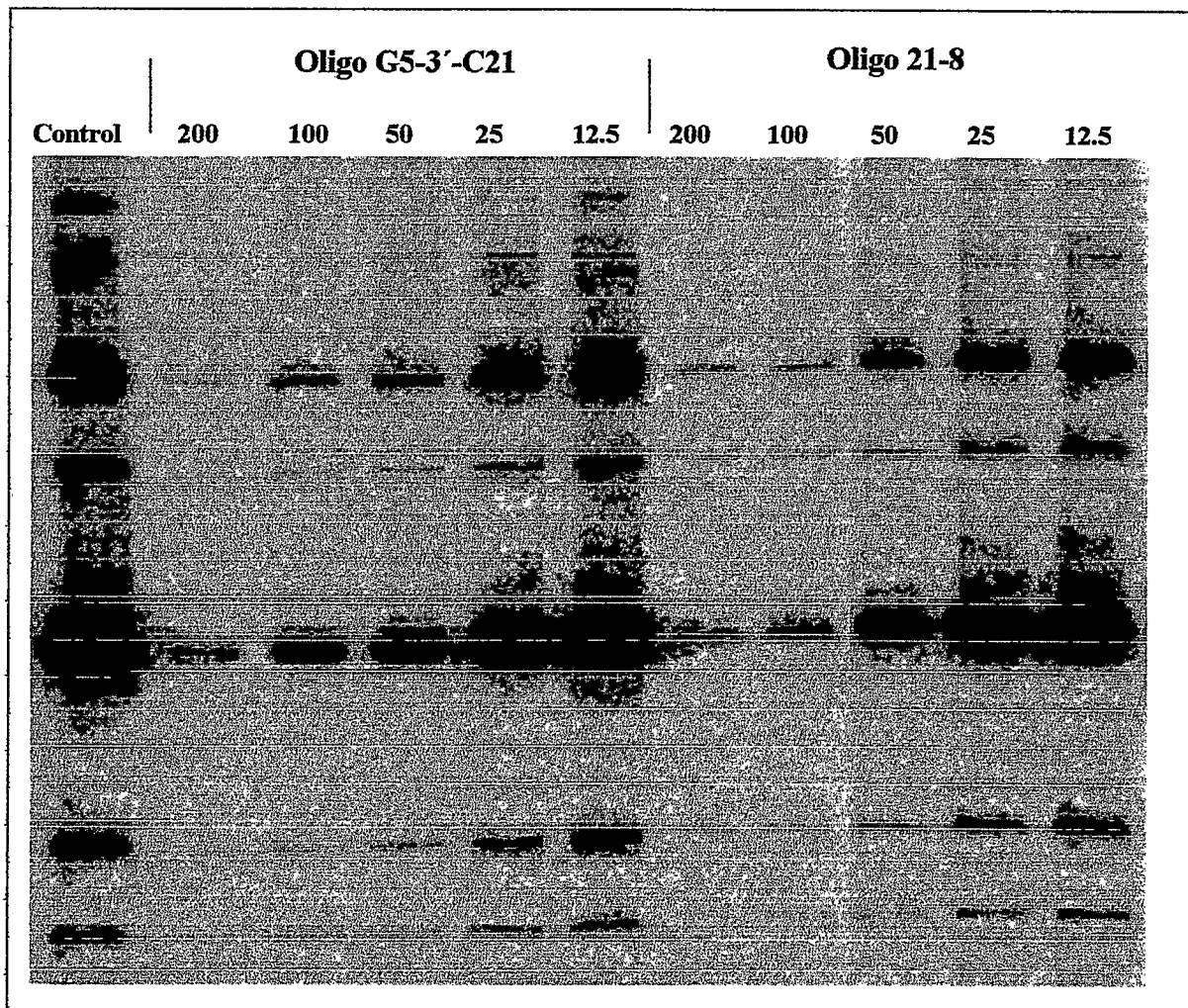
**Figura 23. El dsRNA del Virus de la Necrosis Pancrática Infecciosa no afecta la replicación endógena y tampoco es utilizado como molde por los "open cores".**

Autorradiografía de un gel de poliacrilamida-Tris Glicina 12% donde fueron analizados los productos de las reacciones en las que 1  $\mu\text{g}$  de "open cores" provenientes de la cepa de rotavirus SA11-4F fueron incubados en condiciones indicadas de replicación "in vitro", en presencia de  $[\alpha^{32}\text{-P}]\text{UTP}$ , en presencia y ausencia de cantidades crecientes de dsRNA genómico del IPNV.

### **15- Efecto de oligonucleótidos dirigidos contra el extremo 3' del gen 5 sobre la replicación endógena.**

Hasta ahora se ha comprobado que las señales reconocidas por el sistema replicativo durante la síntesis de la hebra negativa difieren de las señales utilizadas para realizar la replicación endógena. El uso de un RNA con estructura de tallo y horquilla inhibe solo la replicación endógena. Por lo tanto, si se inhiben específicamente las señales de uno de los dos eventos, el otro no debería afectarse. Basado en este planteamiento se utilizó en un ensayo de replicación endógena los oligos G5 3'-C21 y 21-8 (Tabla 3). El primero inhibe en un 100% la síntesis de la hebra negativa del gen 5 de la cepa SA11-4F al impedir la formación de simple hebra en las últimas 6 bases del extremo 3'. El segundo aparentemente impide el reconocimiento de la estructura de tallo y horquilla.

El resultado obtenido muestra como ninguno de los dos oligos ocasionó un efecto inhibitorio sobre la replicación endógena del 'open core' de SA11-4F (Figura 24). Cabe destacar que en este ensayo se utilizaron concentraciones mucho mayores a la de los experimentos anteriores de inhibición de la síntesis de la hebra negativa. Si bien se observa una disminución de la replicación endógena a altas concentraciones de ambos oligos, ésta es inespecífica pues resultados similares fueron obtenidos con un oligo no específico para Rotavirus (dato no mostrado).



**Figura 24. Los oligonucleótidos G5 3'-C21 y 21-8 no inhiben específicamente la replicación endógena del gen 5.**

Autorradiografía de un gel de poliacrilamida-Tris Glicina 12% donde fueron analizados los productos de las reacciones en las que 1µg de "open cores" provenientes de la cepa de rotavirus SA11-4F fueron incubados en condiciones indicadas de replicación "in vitro", en presencia de [ $\alpha^{32}$ -P]UTP, en presencia y ausencia de cantidades diferentes de los oligonucleótidos G5 3'-C21 y 21-8.

## **16- Estudio del papel del extremo 5' del gen 5 de la cepa SA11-4F sobre la síntesis de su hebra negativa.**

La inhibición parcial de la síntesis de hebra negativa al mutar algunas bases del extremo 5' del mRNA, ha permitido postular la presencia de señales importantes en el extremo 5'- (Patton y cols., 1996). Basado en el análisis estructural del gen 8 de la cepa SA11-4F, se postuló la interacción de los extremos 3' y 5' de este gen con la formación de una estructura de mango y sartén (Chen y Patton, 1998). Aunque, nuestros modelos de estructura de RNA de los restantes 10 segmentos obtenidos utilizando el programa Mfold (Datos no mostrados) no producen una estructura de mango y sartén, no desechamos el papel del extremo 5' en el evento de síntesis de la hebra negativa.

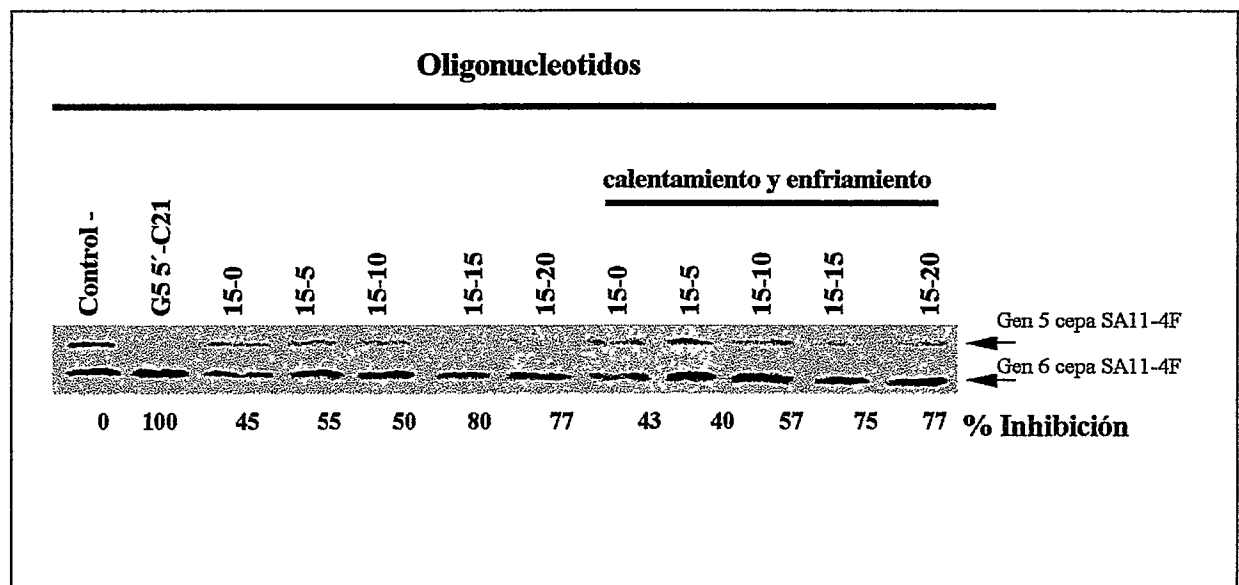
Con el propósito de estudiar el papel del extremo 5' durante la síntesis de la hebra negativa, fueron utilizados 'open core' de DxRRV y mRNA de la cepa SA11-4F en presencia de 5 oligos dirigidos contra diferentes regiones del extremo 5' de la cepa SA11-4F(Tabla 4).

Simultáneamente fueron realizados ensayos donde la mezcla de oligo y mRNA se sometió a un proceso de calentamiento y enfriamiento similar al realizado sobre los tRNAs. Este proceso de denaturalización y renaturalización se realizó para descartar la formación de alguna estructura secundaria estable que interfiriese en la hibridación de los oligos.

Como se observa en la figura 25 los oligos dirigidos contra el extremo 5' del gen 5 inhibieron específicamente hasta en un 80% la síntesis de su hebra negativa, indicando la presencia en este extremo de señales importantes para el evento de síntesis. En este caso, a diferencia del extremo 3' del mRNA, no se observa una inhibición total y

aparentemente los oligos dirigidos contra el extremo del gen no son los más efectivos. Oligonucleótidos que hibridan desde la posición 15 al 35 del mRNA del gen 5 producen un efecto más agudo sobre la síntesis de la hebra negativa. Si bien un procedimiento de denaturalización y renaturalización en presencia de los oligos afectaría la formación de la estructura mango-sartén, no observamos un cambio en el patrón de inhibición. Esto nos sugiere la ausencia de una estructura secundaria que impida el acceso de los oligos al extremo 5' del mRNA del gen 5





**Figura 25.** La región entre los nucleótidos 15-35 del extremo 5' del gen 5 de la cepa SA11-4F contiene señales importantes en la síntesis de la hebra negativa complementaria al mRNA de este gen.

Fragmento de la autorradiografía de un gel de poliacrilamida-Tris Glicina 12% donde aparecen los genes 5 y 6 de los productos de las reacciones en las que "open cores" provenientes de la cepa de rotavirus DxRRV que fueron incubados en condiciones indicadas de replicación "in vitro", en presencia de  $[\alpha^{32}\text{-P}]\text{UTP}$ , de 200ng de los 11 mRNAs obtenido a partir de la cepa SA11-4F y de diferentes oligonucleótidos dirigidos contra el extremo 5'- del gen 5 (Tabla 4). En el pie de la figura aparece el porcentaje de inhibición de la hebra negativa del gen 5 de la cepa SA11-4F. El 0% de inhibición corresponde con la síntesis de la hebra negativa del gen 5 de la cepa SA11-4F en ausencia de oligonucleótidos. Los demás valores de porcentaje de inhibición se calculan en proporción con el control. Como control de inhibición se utilizó el oligo G5 3'-C21 (Tabla 3)

**Tabla 4. Secuencia de los oligonucleótidos antisentidos dirigidos contra diferentes regiones del extremo 5' de la cepa SA11-4.**

Cada oligonucleótido de la serie 15-n, está desplazado en 5n bases respecto al oligonucleótido 15-0, el cual hibrida sobre las primeras 15 bases del extremo 5' del gen 5 de la cepa SA11-4F. En el extremo inferior de la tabla aparece en color rojo la secuencia del extremo 5' del gen 5 de la cepa SA11-4F. Los oligos están distribuidos dentro de la tabla permitiendo determinar la zona del gen 5 que está siendo analizada. El porcentaje de replicación del gen 5 en presencia del oligonucleótido antisentido aparece en el extremo derecho de la tabla.

Oligonucleótido	Secuencia	% Replic.
15-0	3'-CGAAAAAAAAACTTT-5'	55
15-5	3'-AAAAAACTTTTCAGA-5'	45
15-10	3'-AACTTTTCAGAACACA-5'	50
15-15	3'-TTCAGAACACAATCGG-5'	20
15-20	3'-AACACAATCGGTACCG-5'	23
5'-GCUUUUUUUUGAAAAGUCUUGUGUUAGCCAUGGC- 3'		

## DISCUSIÓN.

Uno de los objetivos de la presente tesis ha sido determinar algunas de las propiedades del proceso de síntesis de la hebra negativa durante la replicación del genoma del rotavirus. Con este propósito se utilizó un ensayo de replicación *in vitro* conocido como "open cores", descrito por Chen y cols (1994). Los "open cores" realizan la síntesis del dsRNA a partir de un molde de RNA de simple hebra que contenga las secuencias no traducibles (UTRs) en sus extremos 3' y 5' similares a las presentes en los mRNAs virales (Wentz y cols., 1996a). El sistema también puede usar como molde en la síntesis de dsRNA, al RNA genómico presente en los "open cores" (Chen y cols., 1994). El uso de este molde indica que el sistema puede acoplar la transcripción a la síntesis de la hebra negativa, originándose como producto un dsRNA idéntico al molde usado. Por lo tanto, en presencia de un dsRNA endógeno ambos eventos de síntesis tienen lugar con la participación única de los polipéptidos del core viral VP1, VP2 y VP3.

La síntesis del genoma viral involucra dos etapas. Una de ellas es la síntesis de la cadena positiva en la cual el dsRNA genómico actúa como molde para la síntesis de mRNAs. Los mRNAs tienen dos destinos: ser usados durante la síntesis de proteínas virales o servir de molde en la segunda etapa de replicación (síntesis de la hebra negativa). Ambas etapas ocurren en lugares diferentes del citoplasma de la célula infectada. La transcripción está principalmente asociada a la partícula viral infecciosa y en la misma sólo participan proteínas estructurales. Por otra parte, la síntesis de la hebra

negativa ocurre en el viroplasma donde tanto proteínas estructurales y no-estructurales están presentes (Patton y Spencer, 2000).

Sin embargo, como se muestra en la figura 5, el sistema de "open core" puede usar como molde dsRNA exógeno. Este hallazgo resulta de gran importancia pues los antecedentes descritos en la literatura indicaban que el sistema de replicación solo podía usar como molde de doble hebra al RNA endógeno el cual había sido colocado allí durante el ensamblaje del virus y copurificado en el interior de los "open cores". Así, el complejo formado por VP1-VP2-VP3 es capaz de transcribir usando el dsRNA genómico como molde. Este hallazgo confirma la hipótesis acerca de la no-participación de VP6 en el evento de transcripción por lo cual VP6 solo estaría involucrada en el evento de extrusión de los mRNAs de la partícula de simple cubierta. Por otra parte, el uso de un dsRNA exógeno de una cepa diferente a la del "open core" demuestra que la afinidad del open core hacia el dsRNA de rotavirus es una característica propia y no depende de VP6 ni de otras proteínas del viroplasma. La capacidad de los "open core" de SA11-4F de utilizar como molde a segmentos del genoma de las cepas DxRRV y SA11-4F, lo cual demuestra la existencia de una condición general presente en cada uno de los segmentos usados. Esto último permite postular el reconocimiento de señales generales en los dsRNAs genómicos por el complejo VP1-VP2-VP3.

La cuantificación de la cantidad de producto obtenido usando ambos tipos de moldes, indica la ausencia de competencia del molde exógeno por la misma molécula de polimerasa comprometida en la síntesis de RNA usando el molde endógeno (Figura 6). Estos resultados sugieren que la actividad transcripcional presente en el "open core" es

capaz de reconocer señales en el dsRNA molde para la iniciación de la transcripción. Por otra parte, nos indica que la iniciación de la transcripción no solo se basa en la organización de las proteínas de la cápside y del molde definida durante el proceso de ensamblaje viral. Algunas señales parecen estar presente solo en los segmentos del dsRNA de rotavirus, pues un dsRNA de una fuente no-reoviral como el Virus de la Necrosis Pancreática no fue usado como molde ni actuó como inhibidor de la replicación endógena (Figura 23). Esto nos indica como la presencia del "cap" o de secuencias específicas en los extremos de cada segmento, podrían ser responsables del reconocimiento necesario para la iniciación.

El "open core" utilizó mRNA exógeno en lugar del molde endógeno, sugiriendo una interacción no muy fuerte entre la polimerasa (VP1) y el molde endógeno. Como se observa en la figura 7 la adición de los 11 mRNAs virales promovió de manera preferencial la síntesis de sus hebras negativas sobre el uso del dsRNA genómico. Este desplazamiento del dsRNA genómico indica una mayor afinidad por la señal presente en el mRNA. Este resultado corrobora los experimentos previos en los cuales se demostró una alta afinidad de VP1 por el extremo 3' de los mRNAs de rotavirus (Gouet y cols., 1999). La afinidad preferencial podría evitar el uso de un nuevo dsRNA como molde durante la replicación debido a la presencia de un RNA de simple hebra. La señal es común entre los mRNAs de diferentes cepas, pues todos los mRNAs producen un desplazamiento similar en el uso del dsRNA endógeno.

Esta propiedad de los "open core" ha permitido estudiar los requerimientos específicos durante la síntesis de la hebra negativa de cada uno de los segmentos de RNA (Patton y

cols., 1999). Es importante señalar la presencia en la partícula madura de una única copia de cada segmento de RNA, por lo cual cada segmento contiene la información necesaria para el ordenamiento de los genes (Joklik y cols., 1998). El análisis comparativo de la secuencia de los extremos de estos genes indica la posible existencia de una secuencia consenso (Patton y cols., 1996).

Con el objetivo de determinar la presencia de señales de replicación comunes entre los genes, los "open core" fueron incubados con oligonucleótidos complementarios al extremo 3' del gen 5 y mRNA total de la cepa SA11-4F. Como se muestra en la figura 9 la síntesis de la hebra negativa del gen 5 fue inhibida de manera concentración-dependiente. Además la adición del oligo a una concentración capaz de inhibir en un 100% la replicación del gen 5, no afecta la replicación de los otros genes. Estos hallazgos nos llevaron a estudiar el grado de especificidad de la señal presente en el molde. Con este fin, se utilizó mRNA total de la cepa DxRRV de rotavirus la cual difiere de la cepa SA11-4F en la incorporación de un residuo de adenina cerca del CCA. Como se demuestra en la figura 9 (panel B) no hubo inhibición en la síntesis de la hebra negativa del gen 5 de la cepa DxRRV, indicando la presencia de una alta especificidad de la señal de reconocimiento.

A pesar de la especificidad en la señal del extremo 3'- del mRNA, el sistema de replicación permite cambios de dos bases en las últimas 21 bases del extremo 3'- (excluyendo el CCA). Esto se comprobó mediante el uso de oligos con dos bases mutadas, los cuales mantuvieron su especificidad en la inhibición (Figura 10). Por lo

tanto, las señales presentes en los últimos 21 nucleótidos del extremo 3'- que diferencian a cada gen deben ser de más de 2 bases.

Dentro de esta región de 21 bases aparentemente no todas juegan un papel primordial en la señal de reconocimiento. Como se observa en la figura 11 solamente los oligonucleótidos con la secuencia complementaria a algunas de las últimas 9 bases del extremo 3'- fueron capaces de inhibir específicamente (al menos en un 50%) la síntesis del segmento de doble hebra del gen 5. De esta observación se concluye que durante el evento de síntesis se requiere al menos 9 bases libres en el extremo 3'- del mRNA y las próximas 12 bases parecen no estar involucradas en este evento. Las últimas 6 bases del extremo 3' de los mRNAs deben estar en forma de simple hebra para poder ser utilizadas por los "open cores" como moldes en la síntesis de la hebra negativa. El análisis de estructura secundaria de los 11 mRNAs virales y experimentos utilizando oligonucleótidos antisentidos apoyan esta conclusión.

Otra de las aproximaciones experimentales utilizadas para definir las propiedades de esta señal consistió en la síntesis de una serie de oligonucleótidos de 21 mers donde cada uno estaba desplazado en 3 bases a partir del extremo 3'- (tabla 3). La inhibición observada en la figura 12 se obtuvo al utilizar un oligo que hibrida sobre los primeros 6 nucleótidos del molde SA11-4F. Resultados similares de inhibición de la síntesis de la hebra negativa se han obtenido cuando se elimina el extremo del molde ó cuando el CCA no se encuentra libre (Patton y cols., 1996). Los oligos complementarios a los nucleótidos del 15 al 42 resultaron inhibitorios para ambas cepas, indicando que esta región comparte características comunes necesarias para el evento de replicación. Como el grado de inhibición observado en esta región es similar para dos mRNAs del mismo

gen pero de cepas diferentes, es posible postular la presencia de una señal general para este gen.

La inhibición de la síntesis de la hebra negativa originada por la hibridación de los oligos en esta región podría explicarse por dos vías. El oligo podría afectar la elongación de la hebra negativa ó la estructura del mRNA reconocida por la VP1. De ser cierta la primera alternativa, el uso de un oligo complementario a las bases de la 21 a la 42 originaría la formación de productos de RNA de talla pequeña no mayores de 21 nucleótidos de longitud. Sin embargo, en el análisis de los productos de reacción mediante electroforesis en condiciones denaturantes no se observaron productos de esta talla (figura 13, panel B). Los resultados obtenidos sugieren que en la interacción de VP1 con el dsRNA podría estar involucrada una señal de reconocimiento diferente a la del extremo 3'- del molde de simple hebra. En la partícula viral la polimerasa es ensamblada con el dsRNA pero en la síntesis de la hebra negativa se requiere una unión inicial al molde para así definir la región en la cual se posicionará la molécula proteica (Patton y cols., 1996). Por lo tanto, la presencia de los oligos podría interferir con la unión de la polimerasa (VP1) al molde. En esta unión inicial de la polimerasa parecen estar involucradas dos regiones, una en los primeros 6 nucleótidos y la otra desde los nucleótidos 15 al 42. De esta manera debe existir en el extremo 3'- una señal muy específica para cada gen y una región interna para el sitio inicial de unión de la polimerasa. No obstante, ambas regiones deben ser reconocidas simultáneamente pues la interferencia en el reconocimiento de éstas provoca la inhibición de la síntesis de la hebra negativa. Estas regiones no necesariamente tienen la misma secuencia pero si una



estructura secundaria similar para ser reconocida por la polimerasa viral. Por ejemplo proteínas involucradas en la síntesis de proteínas reconocen diferentes tipos de tRNA-aminoacetilados (Chizhikov y Patton, 2000; Piron y cols., 1998; Poncet y cols., 1994).

Esta especificidad podría estar relacionada con el proceso de ordenamiento de los 11 segmentos virales durante la formación de la partícula viral, evitándose así la incorporación repetida de un segmento dentro del virión.

El alineamiento de las secuencias de los extremos 3' de la hebra positiva de seis genes de la cepa SA11-4F según el programa CLUSTAL W (1.8), mostró un bajo grado de similitud entre los extremos, resultando común un CCA entre ellos (figura 14 panel A).

Como la polimerasa viral reconoce un número limitado de características en un molde, es difícil pensar que cada gen de cada cepa contenga una señal diferente para el reconocimiento. Considerando el bajo grado de similitud de secuencia entre los genes, la presencia de una estructura secundaria común podría ser una de las señales requeridas para el reconocimiento. Una manera de determinar estructuras secundarias comunes es modelar la estructura secundaria del cada uno de los extremos 3' de los mRNAs virales y comparar los modelos. Existen varios programas de modelaje de estructura secundaria de RNAs, básicamente todos ellos optimizan la estructura de un RNA de secuencia dada, hasta obtener una estructura de mínima energía. En nuestro caso utilizamos Mfold y modelamos los últimos las secuencias de las últimas 75 y 100 bases de los extremos 3' de todos los genes de la cepa SA114F. Todos los modelos tenían en común la presencia de una estructura de tallo y horquilla relativamente cerca del extremo 3'. Un ejemplo de la estructura secundaria del extremo 3'- propuesta para el gen 5 de la cepa SA11-4F se

muestra en la figura 14 panel B. Es de resaltar que dentro de la estructura de tallo y horquilla se encuentra la región entre las bases 33-41 descrita en el ensayo anterior (Figura 15 panel B). La secuencia del gen 5 de la cepa DxRRV muestra cuatro cambios en la región de la horquilla con respecto al gen 5 de la cepa SA11-4F, sin embargo todos ellos conservan la estructura de la horquilla (Figura 15 panel A). La conservación de regiones de apareamiento de bases en una molécula de RNA se asocia a una función importante (Tinoco Jr. y Bustamante, 1999). El requerimiento de estructuras similares en la molécula de RNA se ha demostrado en otros sistemas virales para la síntesis de ácidos nucleicos o para el empaquetamiento (Weininger y Maizels, 1987; Pappalardo y cols., 1998; Harrich y cols., 2000; Yu y cols., 2000).

El uso de oligonucleótidos antisentido ha demostrado ser un poderoso instrumento para determinar la especificidad de las señales *cis* en los genes de rotavirus. El gen 5 fue seleccionado como modelo para estudiar los requerimientos del extremo 3' y de la estructura de tallo y horquilla. En el extremo 3' de este gen los primeros 16 nucleótidos a continuación del CCA forman una región de simple hebra, los nucleótidos del 17 al 44 forman una estructura de tallo y horquilla quedando el lazo entre los nucleótidos 27 al 31. El uso de oligonucleótidos antisentidos de 12 mers en presencia de mRNAs exógenas de la cepa SA11-4F confirmó los resultados mostrados anteriormente con relación al papel de la estructura secundaria y de la región CCA en forma de simple hebra como señales *cis* importantes para la replicación viral (figuras 16 y 17). Por otro lado, estos experimentos sugieren que la región del lazo en conjunto con el extremo del tallo orientado hacia el 5' del gen parecen ser las regiones críticas del reconocimiento.

Según los resultados anteriores el sistema de replicación estaría reconociendo alguna señal en los mRNAs por la cual tendría una mayor afinidad con relación a las señales presentes en el dsRNA genómico (Figura 8). Entre ambos tipos de moléculas aparentemente existen dos diferencias estructurales importantes. En los mRNAs virales las seis últimas bases que contienen una secuencia CCA en el extremo 3'- están desapareadas. La otra diferencia es la posible presencia de una estructura de tallo y horquilla en el extremo 3'- de todos los mRNAs virales. Estas características estructurales de los mRNAs de rotavirus también están presentes en otras moléculas de RNA como son los tRNAs de levadura (Quigley y cols., 1978), por lo tanto las moléculas de tRNA podrían producir un efecto similar sobre la replicación endógena. Los resultados mostrados en las figuras 18 y 20 muestran como el tRNA inhibe eficientemente el uso de dsRNA endógeno y exógeno como molde. Por el contrario a concentraciones similares es incapaz de inhibir la síntesis de hebra negativa en presencia de mRNA de rotavirus exógeno como molde, aún a concentraciones de dsRNA 10 veces mayor que de mRNA. Así la señal presente en el tRNA podría eficientemente competir por la molécula de polimerasa con el dsRNA molde pero no con aquella señal presente en cada uno de los 11 mRNAs virales. Esta conclusión es fuertemente apoyada por los ensayos donde la estructura del tRNA fue alterada por un proceso de calentamiento y enfriamiento (figura 21). Paralelamente estos ensayos demostraron una mayor importancia de la estructura secundaria en el tRNA de levadura con relación al requerimiento del extremo CCA, pues el procedimiento de calentamiento y enfriamiento solo afecta el plegamiento de la molécula de tRNA y no el extremo CCA. Estos resultados podrían explicar el papel inhibitorio del mRNA viral sobre la replicación

cuando el dsRNA endógeno es usado como molde, indicándonos que la estructura del extremo 3'- presente en el molde es una señal de reconocimiento importante involucrada en la síntesis de la hebra negativa.

Esta conclusión es también sustentada por los experimentos mostrados en la figura 22 donde una molécula de RNA de simple hebra con una estructura de tallo y horquilla y una adenina adicional en el CCA del extremo 3'- tiene un efecto similar sobre la replicación endógena. No obstante, el RNA Mauriceville inhibió con una mayor eficiencia en comparación con el tRNA, (Figura 22 panel B). Estas diferencias podrían atribuirse a una mayor afinidad del sistema de replicación por la estructura del RNA Mauriceville, el cual a diferencia del tRNA es reconocido por una polimerasa RNA dependiente más cercana evolutivamente a la RNA polimerasa de rotavirus (Wang y cols., 1992; Singer, 1995; Mans y cols., 1991). A pesar de la presencia de esta estructura, el RNA Mauriceville no es usado como molde por el sistema de replicación, por lo cual otras señales como el CCA en el extremo 3', una distancia adecuada entre el extremo y el tallo o secuencias específicas en la horquilla de los mRNAs de rotavirus también serían importantes en este evento. La estructura de tallo y horquilla es necesaria pero no suficiente para que un mRNA sea utilizado como molde en la síntesis de su hebra negativa.

El ensayo mostrado en la figura 23 demuestra el papel de la estructura en el sistema de replicación ya que el dsRNA de IPNV carente de la estructura de tallo y horquilla no inhibe la replicación endógena.

El sistema de "open core" puede catalizar la reacción de polimerización usando dos moldes diferentes: mRNAs y dsRNA genómico de rotavirus. En ambos casos los "open cores" parecen reconocer señales diferentes pues los oligos inhiben la síntesis de la hebra negativa cuando se usa mRNA viral como molde pero no cuando se emplea dsRNA endógeno (Figura 24). La ausencia de inhibición específica sobre el dsRNA endógeno podría atribuirse a dos aspectos. En primer lugar, la polimerasa en presencia de un dsRNA como molde, inicialmente realizaría la síntesis de la hebra positiva en cuyo evento no participa la zona complementaria al oligo. En segundo lugar una vez concluida la síntesis de la hebra positiva la polimerasa quedaría ubicada sobre el 3' del mRNA evitando de esta manera el acceso del oligonucleótido. Resultados similares se obtuvieron aún con dos oligonucleótidos diferentes, un oligo complementario a los últimos 21 nucleótidos del extremo 3' (G5-3-C21) y el otro a la región involucrada en la estructura de tallo y horquilla (21-8). Por lo tanto, en el "open core" la polimerasa reconoce un grupo de señales en el dsRNA molde y otras en el molde de simple hebra. La secuencia señal de reconocimiento para el sistema en el caso de mRNA molde está relacionada con la estructura secundaria de la molécula de RNA la cual no se forma en el dsRNA molde. Así el uso de ambos moldes (dsRNA y mRNA) por el sistema de "open core" podría inhibirse mediante estrategias diferentes, permitiéndonos estudiar ambos eventos por separado.

Existen antecedentes (Patton y cols., 1996) donde se demuestra la participación del extremo 5' de los mRNAs virales en la síntesis de la hebra negativa del genoma de Rotavirus. En el ensayo descrito en esta tesis (figura 25) se utilizaron oligonucleótidos antisentidos para estudiar la importancia de este extremo del mRNA viral en dicho

evento. La inhibición observada demuestra la participación del extremo 5' en la síntesis de la hebra negativa. El extremo 5' debe estar libre para lograr una síntesis eficiente de la hebra negativa. Además, la región interna entre las bases 15-35 del extremo mostró ser más sensible al efecto inhibitorio de los oligonucleótidos, lo cual no deshecha la presencia en esa región de señales de reconocimiento importante para una síntesis óptima de la hebra complementaria al mensajero viral. Los experimentos donde se realizó un calentamiento y enfriamiento lento de la mezcla mRNA-oligo para promover la interacción entre ambos, produjeron resultados similares a los realizados sin usar este proceso. Este resultado indica la ausencia de una estructura secundaria que impida la acción del oligonucleótido, debilitando así la hipótesis de una estructura secundaria donde ambos extremos forman un "mango-sartén". Modelos de estructura secundaria construidos para cada mRNA genómico de Rotavirus mostraron que la interacción entre los extremos de los mRNAs era un evento poco probable. Se ha observado que el plegamiento del RNA ocurre de manera acoplada a su síntesis, por lo que es probable que se formen estructuras secundarias a medida que va creciendo la molécula de RNA. Esto dificulta la interacción directa entre los extremos, sobre todo en moléculas de RNA de mayor tamaño (Tinoco Jr. y Bustamente, 1999).

Los hallazgos presentados en esta tesis acerca de las señales de reconocimiento involucradas en los procesos de síntesis del RNA de rotavirus nos permitirían estudiar nuevas estrategias con el fin de desarrollar genética reversa y así poder definir la patogénesis de los rotavirus.

## CONCLUSIONES.

- Los “open cores” virales utilizan como molde de replicación tanto el dsRNA propio incluido en su estructura, como un dsRNA viral añadido de manera exógena. Este dsRNA viral puede ser heterólogo.
- Los “open cores” prefieren el uso de mRNA como molde en relación con el dsRNA. El mRNA contiene una señal de mayor afinidad, lo cual permite que el mRNA viral de una cepa pueda ser usado por “open cores” de otra cepa desplazando al dsRNA original de la cepa nativa.
- La inhibición de la síntesis de hebra negativa es específica para el gen sobre el cual hibridan los oligonucleótidos antisentidos.
- Las señales comunes entre los mRNAs de rotavirus para la síntesis de la hebra negativa son una secuencia CCA en el extremo 3' y una probable estructura secundaria de tipo tallo y horquilla en la región río arriba a la secuencia consenso del 3' UTR.
- Las regiones importantes en la estructura de reconocimiento de los mRNAs lo constituyen la horquilla y las bases que forman el extremo 5' del tallo.
- El 5'- UTR participa en la síntesis de la hebra negativa de los mRNAs. La formación de simple hebra en este extremo contribuye a la eficiencia del evento de síntesis.

## BIBLIOGRAFÍA.

- Afrikanova, I., Fabbretti, E., Miozzo, M.C. and Burrone, O. 1998. Rotavirus NSP5 phosphorylation is up-regulated by interaction with NSP2. *J. Gen. Virol.* 79: 2679-2686.
- Ardern-Holmes, S.L., Lennon, D., Pinnock, R., Nicholson, R., Graham, D., Teele, D., Schousboe, M., Gillies, M., Hollis, B., Clarkin, A.-M., Lindeman, J. and Stewart, J. 1999. Trends in hospitalization and mortality from Rotavirus disease in New Zealand infants. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 18 (7): 614-619.
- Banerjee, A.K., and Shatkin, A.J. 1970. Transcription in vitro by reovirus-associated ribonucleic acid-dependent polymerase. *J. Virol.* 6: 1-11.
- Bern, C., Martines, J., de Zoysa, I. and Glass R.I. 1992. The magnitude of the global problem of diarrhoea disease: a ten year update. *Bull. World Health Organ.* 70:705-714.
- Both, G.W., Bellamy, A.R. y Mitchell, D.B. 1994 Rotavirus protein structure and function. *Cur. Topics Micro.Immunol.* 185: 67-105.
- Both, G.W., Bellamy, A.R. y Siegman, L.J. 1984. Nucleotide sequence of the dsRNA genomic segment 7 of Simian 11 rotavirus. *Nucleic Acids Res.* 12: 1621-1626.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of proteins utilising the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Chen D., Ramig R. 1992. Determinants of rotavirus stability and density during CsCl purification. *Virology.* 186:228-237.
- Chen, D.Y., Zeng, C.Y., Wentz, M.J., Gorziglia, M., Estes, M.K., and Ramig, R.F. 1994. Template-dependent, in vitro replication of rotavirus RNA. *J. Virol.* 68: 7030-7039.
- Chen, D., and Patton, J.T. 1998. Rotavirus RNA replication requires a single-stranded 3'-end for efficient minus-strand synthesis. *J. Virol.* 72: 7387-7396.
- Chen, D., Barro, M., Spencer, E., Patton, J.T. 2001. Features of the 3'-consensus sequence of rotavirus mRNAs critical to minus strand synthesis. *Virology* 282:221-229.
- Chizhiko, V. and Patton, J.T. 2000. A four-nucleotide translation enhancer in the 3'-terminal consensus sequence of the nonpolyadenylated mRNAs of rotavirus. *RNA* 6: 814-825.



Ciarlet, M. and Estes, M.K. 1999. Human and most animal Rotavirus strains do not require the presence of sialic acid on the cell surface for efficient infectivity. *J. Gen. Virol.* 80: 943-948.

Cohen, J. 1977. Ribonucleic acid polymerase activity associated with purified calf rotavirus. *J. Gen. Virol.* 36: 395-402.

Cook, S.M., Glass, R.I., LeBaron, C.W. and Ho, M.-S. 1990. Global seasonality of Rotavirus infections. *Bull. World Health Organ.* 68: 171-177.

Estes, M.K. 1996. Rotaviruses and their replication, p. 731-761. In B.N. Fields, D. Knipe, Howley, et al. (ed.), *Fundamental Virology*, 3rd ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA.

Fauquet, C. 1994. Taxonomy and classification-general. In Webster, R.G. & Granoff, A. (eds) *Encyclopedia of Virology*, p 1398-1340. Academic Press, San Diego, CA.

Frilander, M., Bamford, D.H. 1995. In vitro packaging of the single-stranded RNA genomic precursor of the segmented double-stranded RNA bacteriophage  $\phi 6$ : the three segments modulate each other's packaging efficiency. *J. Mol. Biol.* 246: 418-428.

Fukudome, K., Yoshie, O. and Konno, T. 1989. Comparison of human, simian and bovine Rotaviruses for requirement of sialic acid in hemagglutination and cell adsorption. *Virology* 172: 196-205.

Gallegos, C.O., and Patton, J.T. 1989. Characterization of rotavirus replication intermediates: A model for the assembly of single-shelled particles. *Virology* 172: 616-627.

Gombold, J.L. y Ramig, R.F. 1994. Genetics of the rotaviruses. *Cur. Topics Micro. Immunol.* 185:129-177.

Gouet, P., Grimes, J.M., Malby, R., Burroughs, J.N., Zientara, S., Stuart, D.I., and Mertens, P.P.C. 1999. The highly ordered double-stranded RNA genome of bluetongue virus revealed by crystallography. *Cell* 97: 481-490.

Harrich, D., Hooker, C.W y Parry, E. 2000. The human immunodeficiency virus type 1 TAR RNA upper stem-loop plays distinct roles in reverse transcription and RNA packaging. *J. Virol.* 74: 5639-5646.

Helmberger-Jones, M. and Patton, J. 1986. Characterization of subviral particles in cells infected with simian rotavirus SA11. *Virology* 155: 655-665.

Herring, A.J., Inglis, N.F., Ojeh, C.K., Snodgrass, D.R. and Menzies, J.D. 1982 Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver stained polyacrylamide gels. *J. Clin. Microbiol.* 16: 473-477.

Hua, J., Mancell, E.A. y Patton, J.T. 1993. Comparative analysis of the rotavirus NS53 gene: conservation of basic and cysteine-rich regions in the protein and possible stem-loop structures in the RNA. *Virology.* 196: 372-378.

Imai M., Akatani K., Ikegami N. y Furuichi Y. 1983. Capped and conserved terminal structures in human rotavirus genome double-stranded RNA segments. *J. Virol.* 47: 125-136.

Joklik, W.K. 1998. Assembly of the reovirus genome. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 233: 57-68.

Kaljot, K.T., Shaw, R.D., Rubin, D.H. and Greenberg, H.B. 1988. Infectious Rotavirus enters cells by direct cell membrane penetration, not by endocytosis. *J. Virol.* 62: 1136-1144.

Kapikian, A.Z. and Chanock, R.M. 1996. Rotaviruses. In *Fields Virology*, 3<sup>rd</sup> ed., pp 1657-1708. Edited by Fields, B.N., Knipe, D.M. and Howley, P.M. Lippincott-Raven, Philadelphia, Pa.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227: 680-685.

Lawton, J.A., Estes, M.K., and Prasad, B.V. 1997a. Three-dimensional visualization of mRNA release from actively transcribing rotavirus particles. *Nat. Struct. Biol.* 4:118-121.

Lawton, J.A., Zheng, C.Q.-Y., Mukherjee, S.K., Cohen, J., Estes, M.K., and Prasad, B.V. 1997b. Three-dimensional structural analysis of recombinant rotavirus-like particles with intact and amino-terminal deleted VP2: implications for the architecture of the VP2 capsid layer. *J. Virol.* 71:7353-7360.

Mans., R.M.W., Cornelis, W.A., and Bosch, L. 1991. tRNA-like structures. Structure, function and evolutionary significance. *Euro. Biochem.* 201:303-324.

Mitchell, D.B. y Both. J.W. 1990 Completion of the genomic sequence of the simian rotavirus SA11: nucleotide sequences of segments 1, 2, and 3. *Virology.* 177:324-331.

Nibert, M.L., Schiff, L.A., Fields, B.N. 1996. Reoviruses and their replication, p. 691-730. In B.N. Fields, D. Knipe, Howley, et al. (ed.), *Fundamental Virology*, 3rd ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA.

- Palmenberg, A.C., and Sgro, J.V. 1997. Topological organization of picornaviral genomes: statistical prediction of RNA structural signals. *Semin. Virol.* 8:231-247.
- Pappalardo, L., Kerwood, D.J, Pelczer, I., and Borer, P.N. 1998. Three-dimensional folding of RNA hairpin required for packaging HIV1. *J. Mol. Biol.* 282:801-818.
- 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.
- Patton, J.T., and Gallegos, C.O. 1990. Rotavirus RNA replication: single-strand RNA extends from the replicase particle. *J. Gen. Virol.* 71:1087-1094.
- Patton, J.T., Salter-Cid, L., Kalbach, A., Mancell, E.A. y Katoura, M.D. 1993. Nucleotide and amino acid sequence analysis of the rotavirus nonstructural RNA-binding protein NS35. *Virology.* 192:438-446.
- 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.
- Patton, J. T., Wentz, M., Xiaobo, J., and Ramig, R.F. 1996. *cis*-Acting signals that promote genome replication in rotavirus mRNAs. *J. Virol.* 70:3961-3971.
- Patton, J.T., Jones, M.T., Kalbach, A.N., He, Y.W., and Xiaobo, J. 1997. Rotavirus RNA polymerase requires the core shell protein to synthesize the double-stranded RNA genome. *J. Virol.* 71:9618-9626.
- Patton, J.T., Chnaiderman, J., and Spencer, E. 1999. Open reading frame in rotavirus mRNA specifically promotes synthesis of double-stranded RNA: Template size also affects replication efficiency. *Virology* 264:167-180.
- Patton, J.T., y E. Spencer. 2000. Genome replication and packaging of segmented double-stranded RNA viruses. *Virology.* 277:217-225.
- Patton, J.T., Taraporcwala, Z., Chen, D., Chizhikov, V., Johns, M., Elhclu, A., Collins, M., Kearney, K., Wagner, M., Hoshinoy, Y., and Govea, V. 2001. Effect of intragenic rearrangement and changes in the 3' consensus sequence on NSP1 expression and rotavirus replication. *J. Virol.* 75:2076-2086.
- Piron, M., Vende, P., Cohen, J., and Poncet, D. 1998. Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4G1 and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F. *EMBO J.* 17:5811-5821.
- Poncet, D., Laurent, S., and Cohen, J. 1994. Four nucleotides are the minimal requirement for RNA recognition by rotavirus non-structural protein NSP3. *EMBO J.* 13:4165-4173.

Prasad, B.V.V., Wang, G.J., Clerx, J.P.M. and Chiu, W. 1988. Three-dimensional structure of rotavirus. *J. Mol. Biol.* 199:269-275.

Prasad, B.V.V., and Estes, M.K. 2000. Electron cryomicroscopy and computer image processing techniques, p. 9-31. In J. Gray and U. Desselberger (ed.), *Methods in Molecular Medicine*, Vol. 34: Rotaviruses: Methods and Protocols, Humana Press Inc.,

Prasad, B.V.V., Rothnagel, R., Zeng, C.Q.-Y., Jakana, J., Lawton, J.A., Chiu, W., and Estes, M.K. 1996. Visualization of ordered genomic RNA and localization of transcriptional complexes in rotavirus. *Nature* 382:471-473.

Quigley, G.J., Teeter, M.M. y Rich, A. 1978. Structural analysis of spermine and magnesium ion binding to yeast phenylalanine transfer RNA. *Proc.Natl. Acad. Sci.USA* 75:64-68.

Roy, P. 1996. Orbiviruses and their replication, p. 1709-1734. In B.N. Fields, D. Knipe, Howley, et al. (ed.), *Virology*, 3rd ed., Vol. 2, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA.

Singer, M.F. 1993 Unusual reverse transcriptases. *J. Biol. Chem* 270:24623-24626.

Spencer, E., and Arias, M.L. 1981. In vitro transcription catalyzed by heat-treated human rotavirus. *J. Virol.* 40: 1-10.

Smka, C.A., Tiemeyer, M., Gilbert, J.H., Moreland, M., Schweingruber, H., De Lappe, B.W., James, P.G., Gant, T., Willoughby, R.E., Yolken, R.H., Nashed, M.A., Abbas, S.A. and Laine, R.A. 1992. Cell surface ligands for Rotavirus: mouse intestinal glycolipids and synthetic carbohydrate analogs. *Virology* 190: 94-805.

Stancy-Phipps, S. y Patton, J.T. 1987. Synthesis of plus- and minus-strand RNA in rotavirus-infected cells. *J. Virol.* 61: 3479-3484.

Taraporewala, Z., Chen, C., and Patton, J.T. 1999. Multimers formed by the rotavirus nonstructural protein NSP2 bind to RNA and have nucleoside triphosphatase activity. *J. Virol.* 73:9934-9943.

Tinoco Jr, I. y Bustamante, C. 1999. How RNA folds. *J. Mol. Biol.* 293:271-281.

Wang, H., Kennell, J.C., Kuiper, M.T.R., Sabourin, J.R., Saldanha, R., and Lambowitz, A.M. 1992. The Mauriceville plasmid of *Neurospora crassa*: characterization of a novel reverse transcriptase that begins cDNA synthesis at the 3' end of template RNA. *Mol. Cell. Biol.* 12:5131-5144.

Weiner, A.M., and Maizels, N. 1987. tRNA-like structures tag the 3' ends of genomic RNA molecules for replication: implications for the origin of protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7383-7387.

Wentz, M.J., Patton, J.T., and Ramig, R.F. 1996a. The 3'-terminal consensus sequence of rotavirus mRNA is the minimal promoter of negative-strand RNA synthesis. *J. Virol.* 70:7833-41.

Wentz, M.J., Zeng, C.Q., Patton, J.T., Estes, M.K., and Ramig, R.F. 1996b. Identification of the minimal replicase and the minimal promoter of (-) strand synthesis, functional in rotavirus RNA replication in vitro. *Arch. Virol.* 12:59-67.

Wuju, L., and Jianjin, W. 1998. Prediction of RNA secondary structure based on helical regions distribution. *Bioinformatics* 14: 700-706.

Yu, H., Isken, O., Grassmann, W. y Behrens, S-E. 2000. A stem-loop motif formed by the Immediate 5' terminus of the bovine viral diarrhea virus genome modulates translation as well as replication of the viral RNA. *J. Virol.* 74: 5825-5835.

Zeng, Q.Y., Wentz, M.J., Estes, M.K., and Ramig, R.F. 1996. Characterization and replicase activity of double-layered and single-layered rotavirus-like particles expressed from baculovirus recombinants. *J. Virol.* 70: 2736-2742.

Zuker, M. 1989. The use of dynamic programming algorithms in RNA secondary structure prediction, p. 159-184. In M.S. Waterman (ed.), *Mathematical methods for DNA sequences*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fl.

Zuker, M. 1994. Prediction of RNA secondary structure by energy minimization, p. 267-294. In A.M. Griffin and H.G. Griffin (ed.), *Computer analysis of sequence data, part II*, vol. 25. CRC Press, Inc., Totowa,