



ipbln

 **CSIC**
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

IDENTIFICACIÓN DE MOTIVOS
ESTRUCTURALES EN LA REGIÓN
5' DEL RNA GENÓMICO DEL
WEST NILE VIRUS

TESIS DOCTORAL

Raquel Díaz González

Granada, 2011

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Raquel Díaz González
ISBN: 978-84-1117-138-0
URI: <http://hdl.handle.net/10481/71710>

AGRADECIMIENTOS

Ahora que se acaba una etapa de mi vida en la que, además de aprender "un poquito de RNA", he experimentado un gran crecimiento personal, ha llegado el momento de agradecerle a todas aquellas personas que me han acompañado durante este largo período, el que hayan contribuido de una forma u otra a mi formación tanto académica como personal. Me es imposible nombraros a todos, pero vosotros sabéis quiénes sois y que os estoy muy agradecida.

Gracias a mis directores de Tesis, Jordi y Alfredo, por haberme dado la oportunidad de realizar la Tesis Doctoral bajo su supervisión, por confiar en mí, respetar mis decisiones y ser unos jefes tan cercanos.

Gracias al labo 112. A Cristina, por enseñarme a "dar los primeros pasos" en un laboratorio de biología molecular. A Vicente, por ser un técnico tan genial. Y, como no, a mis niños Kiko y Jose, gracias por ser tan buenos compañeros, haberme ayudado y apoyado en todo. He aprendido mucho de todos vosotros.

A mis niñas del 111, gracias Rosa, gracias Belén y gracias M^a Ascen, porque sois las mejores compañeras de laboratorio que podía haber tenido. Siempre recordaré lo bien que nos lo hemos pasado riéndonos "del jefe y con el jefe", gracias por haberme ayudado en todo y, sobre todo, por haberme aguantado. Y a Samuel, la nueva incorporación, por esos piropos que cada día me subían la moral.

A mis "compis" de biblioteca, que han hecho que esta última etapa de escritura sea más amena. Y a toda la gente del "López-Neyra", gracias por vuestra ayuda.

Gracias al Dr. Carlos Briones, por darme la oportunidad de realizar una mini estancia en su laboratorio y aprender "cositas" nuevas. Gracias Ana y María porque fuisteis geniales conmigo.

A toda mi gente (Mari, Bea, Lidia, Sonia, Belencilla, Elsa, Rosa...) repartida por Almería, Granada y alguna que otra provincia más. Gracias por todo vuestro apoyo y comprensión.

A mis padres, porque siempre se han sacrificado para que pudiera tener una buena formación académica. Y a mi hermano. Gracias por estar siempre ahí, recordarme quién soy y no dejarme tirar la toalla nunca. Os quiero. En especial a mi madre, gracias por esos "tapers" que me hacías de comida, gracias por todos esos abrazos que hacen que todo lo malo se olvide, por llamarme cada noche para ver cómo me había ido el día y por no preguntar cuando no era el momento. Gracias por ser mi madre.

ABREVIATURAS Y SIGLAS

3' UTR	Región 3' no traducible
5' RACE	<i>5' Rapid Amplification of cDNA Ends</i>
5' UTR	Región 5' no traducible
A	Adenina
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
BSA	Albúmina de suero bovino
BVDV	Virus de la diarrea viral bovina
C	Citosina
cDNA	DNA complementario
cpm	Cuentas por minuto
CSFV	Virus de la peste porcina clásica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNasa	Desoxirribonucleasa
dNTP	Desoxirribonucleósido 5'-trifosfato
dsRBD	Dominio de unión a dsRNA
dsRNA	RNA de doble cadena
DTT	Ditiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Ec-RNasa III	RNasa III de <i>E. coli</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
Fig.	Figura
FMDV	Virus de la enfermedad de pie y boca
G	Guanina
HCV	Virus de la hepatitis C
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana
IgM	Inmunoglobulina M
IPTG	Isopropiltiogalactósido
IRES	Sitio de entrada interna al ribosoma (<i>Internal Ribosome Entry Site</i>)
Kb	Kilo par de bases
LB	Medio Luria-Bertani

miRNA	microRNA
mRNA	RNA mensajero
nts	Nucleótidos
oligo	Oligodesoxirribonucleótido
p/v	Relación peso/volumen
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
pre-miRNA	Precursor de microRNA
pre-tRNA	Precursor de tRNA
prM	Proteína premembrana
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	Interferencia de RNA
RNasa	Ribonucleasa
rNTP	Ribonucleósido 5'-trifosfato
RT	Retrotranscripción o transcripción inversa
siRNA	RNA interferente pequeño
t	Tiempo
T	Timina
TEMED	Tetrametiletilendiamina
tRNA	RNA de transferencia
U	Uracilo (en el caso de base nitrogenada) Unidades (en el caso de actividad enzimática)
v/v	Relación volumen/volumen
WNF	Fiebre del <i>West Nile</i>
WNV	<i>West Nile virus</i>
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranósido

ÍNDICE

I.- INTRODUCCIÓN	1
I.1.- <i>WEST NILE VIRUS</i>	1
I.1.1.- DESCRIPCIÓN GENERAL.....	1
I.1.1.1.- Filogenia	2
I.1.1.2.- Epidemiología	2
I.1.1.3.- Situación en España.....	3
I.1.1.4.- Manifestaciones clínicas, diagnóstico y tratamiento	3
I.1.2.- El VIRUS	4
I.1.2.1.- La partícula viral	4
I.1.2.2.- El genoma.....	5
I.1.2.3.- Ciclo de replicación.....	5
I.1.2.4.- Regiones terminales del genoma del WNV	6
I.2.- MIMETISMO MOLECULAR.....	9
I.3.- RNasa III.....	12
I.3.1.- RNasa III de <i>Escherichia coli</i>	13
I.3.2.- RNasa III DICER.....	17
I.4.- RNasa P	20
I.4.1.- RNasa P de <i>Synechocystis sp.</i>	22
I.4.2.- RNasa P HUMANA.....	22
O.- OBJETIVOS	25
M.- MATERIALES Y MÉTODOS	27
M.1.- MATERIALES	27
M.1.1.- MEDIOS DE CULTIVO	27
M.1.1.1.- Medio líquido LB	27
M.1.1.2.- Medio sólido LA (LB-agar)	27
M.1.1.3.- Medio líquido para levaduras.....	27
M.1.2.- TAMPONES.....	28
M.1.2.1.- Tampón TSE 10X	28

M.1.2.2.- Tampón elución T1 10X.....	28
M.1.2.3.- Tampón P 5X.....	28
M.1.2.4.- Tampón Dicer 5X.....	28
M.1.2.5.- Tampón cyano 5X.....	28
M.1.2.6.- Solución para hidrólisis alcalina de RNA 10X.....	29
M.1.2.7.- Tampón para la degradación con RNasa T1 en condiciones desnaturalizantes 2X	29
M.1.2.8.- Tampón desnaturalizante para carga en geles de poliacrilamida 1'5X	29
M.1.2.9.- Tampón no desnaturalizante para carga en geles de agarosa 6X....	29
M.1.2.10.- Tampón de electroforesis TBE 1X.....	30
M.1.2.11.- Tampón de electroforesis TAE 1X.....	30
M.1.3.- CEPAS BACTERIANAS	30
M.1.4.- MOLDES EMPLEADOS PARA LAS REACCIONES DE TRANSCRIPCIÓN	30
M.1.4.1.- Vectores construidos en este trabajo	30
M.1.4.1.1.- pUC19+LC1-704.....	30
M.1.4.1.2.- pUC19+251.....	31
M.1.4.1.3.- pUC19+222.....	31
M.1.4.2.- Otros vectores utilizados en este trabajo.....	32
M.1.4.2.1.- pT76803.....	32
M.1.4.2.2.- pUC19TyrT	32
M.1.4.3.- Moldes de DNA parcialmente de doble cadena	33
M.1.5.- OLIGONUCLEÓTIDOS SINTÉTICOS UTILIZADOS EN LOS MICROARRAYS DE DNA.....	33
M.1.6.- ISÓTOPOS RADIATIVOS.....	34
M.1.7.- PATRONES DE PESO MOLECULAR PARA ELECTROFORESIS	34
M.1.8.- ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS.....	35
M.2.- MÉTODOS	36
M.2.1.- CULTIVO DE BACTERIAS.....	36
M.2.2.- CRIOCONSERVACIÓN DE BACTERIAS	36
M.2.3.- TRANSFORMACIÓN DE <i>E. coli</i> CON PLÁSMIDOS RECOMBINANTES	36
M.2.3.1.- Preparación de células electrocompetentes.....	36
M.2.3.2.- Electroporación.....	37
M.2.3.3.- Selección de colonias recombinantes de <i>E.coli</i>	38
M.2.4.- EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO	38
M.2.5.- EXTRACCIÓN DEL RNA GENÓMICO L-A	38

M.2.6.- SECUENCIACIÓN DE DNA	39
M.2.7.- SÍNTESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	40
M.2.7.1.- Síntesis química de oligonucleótidos.....	40
M.2.7.2.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	40
M.2.7.3.- Síntesis de RNA	41
M.2.7.3.1.- Transcripción <i>in vitro</i>	41
M.2.7.3.2.- Purificación de la transcripción	42
M.2.8.- TÉCNICAS DE MARCAJE RADIOACTIVO DEL RNA.....	42
M.2.8.1.- Marcaje interno	42
M.2.8.2.- Marcaje en el extremo 5'	43
M.2.8.3.- Marcaje en el extremo 3'	43
M.2.9.- ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS	43
M.2.9.1.- En geles de agarosa.....	43
M.2.9.2.- En geles desnaturalizantes de poliacrilamida.....	44
M.2.10.- PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS DE GEL.....	44
M.2.10.1.- Purificación de DNA a partir de geles de agarosa.....	44
M.2.10.2.- Purificación de RNA a partir de geles de poliacrilamida.....	45
M.2.11.- CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	45
M.2.11.1.- Cuantificación mediante espectrofotometría	45
M.2.11.2.- Cuantificación de un RNA marcado con radiactividad en solución .	45
M.2.11.3.- Cuantificación de un RNA marcado con radiactividad inmovilizado en geles de poliacrilamida	46
M.2.12.- ENSAYOS DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS	46
M.2.12.1.- Reacciones con la RNasa III de <i>E. coli</i>	46
M.2.12.2.- Reacciones con la RNasa III eucariota Dicer	47
M.2.12.3.- Reacciones con la subunidad RNA de la RNasa P de la cianobacteria <i>Synechocystis</i> sp. PPC 6803 (Rz6803).....	47
M.2.12.4.- Reacciones con la RNasa P humana	48
M.2.13.- OTRAS REACCIONES.....	48
M.2.13.1.- Proteinasa K.....	48
M.2.13.2.- Circularización de fragmentos de RNA con extremos 5'-fostato y 3'-hidroxilo.....	49
M.2.13.3.- Desfosforilación y fosforilación de un RNA.....	49
M.2.13.4.- Reacciones de retrotranscripción	49
M.2.13.5.- 5' Rapid Amplification of cDNA Ends (5' RACE)	50
M.2.14.- DIGESTIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	51
M.2.14.1.- Digestión del DNA	51

M.2.14.1.1.- Enzimas de restricción.....	51
M.2.14.1.2.- RQ1 DNasa	51
M.2.14.2.- Digestión del RNA	52
M.2.14.2.1.- RNasa T1.....	52
M.2.14.2.2.- RNasa V1	53
M.2.14.2.3.- RNasa A	53
M.2.14.2.4.- Hidrólisis alcalina del RNA.....	54
M.2.15.- MICROARRAYS	54
R.-RESULTADOS	57
R.1.- RNasa III.....	57
R.1.1.- RNasa III de <i>Escherichia coli</i>	57
R.1.1.1.- Ensayo de actividad sobre el RNA WNV 1-702	57
R.1.1.2.- Localización de los productos de corte en relación a los extremos 5' y 3' del RNA WNV 1-702	59
R.1.1.3.- Caracterización de la especificidad del corte.....	60
R.1.1.3.1.- Competiciones enzimáticas	60
R.1.1.3.1.1.- Inhibición competitiva directa	60
R.1.1.3.1.2.- Inhibición competitiva reversa	61
R.1.1.3.2.- Determinación de los grupos químicos de los nuevos extremos generados tras el corte	63
R.1.1.4.- Cinética de corte	66
R.1.1.5.- Análisis del patrón de procesamiento del RNA WNV 1-702 por la Ec-RNasa III.....	67
R.1.1.6.- Condiciones de corte primario y secundario	70
R.1.1.7.- Determinación de la posición del corte en la secuencia del RNA WNV 1-702.....	71
R.1.2.- RNasa III EUCARIOTA DICER.....	72
R.1.2.1.- Ensayo de actividad sobre el RNA WNV 1-702	72
R.1.2.2.- Caracterización de la especificidad de corte.....	73
R.1.2.2.1.- Competiciones enzimáticas	73
R.1.2.2.2.- Determinación de los grupos químicos de los nuevos extremos generados tras el corte	75
R.1.2.3.- Determinación de la posición del corte en la secuencia del RNA WNV 1-702.....	77
R.2.- RNasa P.....	78
R.2.1.- SUBUNIDAD RNA DE LA RNasa P DE <i>Synechocystis</i> sp. PPC 6803	78

R.2.1.1.- Ensayo de actividad sobre el RNA WNV 1-702	78
R.2.1.2.- Localización de los productos de corte en relación a los extremos 5' y 3' del RNA WNV 1-702	79
R.2.1.3.- Caracterización de la especificidad de corte.....	80
R.2.1.3.1- Dependencia de iones	80
R.2.1.3.1.1.- Dependencia de iones magnesio	80
R.2.1.3.1.2.- Dependencia de potasio.....	80
R.2.1.3.2- Determinación de los grupos químicos de los nuevos extremos generados tras el corte	83
R.2.1.4.- Determinación de la posición del corte en la secuencia del RNA WNV 1-702.....	86
R.2.2.- RNasa P HUMANA	87
R.2.2.1.- Ensayo de actividad sobre el RNA WNV 1-702	87
R.3.- ESTUDIO ESTRUCTURAL.....	89
R.3.1.- ESTUDIO ESTRUCTURAL DEL RNA WNV 1-702 MEDIANTE ENSAYOS DE HIBRIDACIÓN A MICROARRAYS DE DNA.....	89
R.3.2.- DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA MEDIANTE MÉTODOS ENZIMÁTICOS	91
R.3.3.- ANÁLISIS DE LA PRESENCIA DE POSIBLES <i>PSEUDOKNOTS</i> EN LOS MOTIVOS ESTRUCTURALES RECONOCIDOS POR LAS RNasas P	95
D.- DISCUSIÓN	97
D.1.- MOTIVOS ESTRUCTURALES RECONOCIDOS POR LA RNasa III ...	97
D.2.- MOTIVOS ESTRUCTURALES RECONOCIDOS POR LA RNasa P ..	100
D.3.- ANÁLISIS DE COVARIACIÓN	102
D.4.- ACCESIBILIDAD DE LAS REGIONES DEL RNA WNV 1-702	106
D.5.- MOTIVOS ESTRUCTURALES RECONOCIDOS POR LAS RNasas III Y P EN LA REGIÓN 5' DE LA FAMILIA <i>Flaviviridae</i>	107
C.- CONCLUSIONES	113
B.- BIBLIOGRAFÍA	115

I.- INTRODUCCIÓN

I.1.- WEST NILE VIRUS

I.1.1.- DESCRIPCIÓN GENERAL

El *West Nile virus* (WNV)^{*} fue aislado en el año 1937 a partir de la sangre de una mujer que sufría una enfermedad febril en el distrito West Nile (Uganda) [Smithburn *et al.*, 1940]. Este virus pertenece al género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae* y se agrupa dentro del complejo antigénico de la encefalitis japonesa [Calisher and Gould, 2003] (Tabla I.1).

Unidad Taxonómica	Ejemplos representativos
Género <i>Flavivirus</i>	
Virus transmitidos por mosquito	
Grupo de la encefalitis japonesa	Virus de la encefalitis japonesa (JEV) <i>West Nile virus</i> (WNV)
Grupo del virus del Dengue	Virus del Dengue (DENV)
Grupo del virus de la fiebre amarilla	Virus de la fiebre amarilla (YFV)
Género <i>Pestivirus</i>	
	Virus de la diarrea viral bovina (BVDV) Virus de la peste porcina clásica (CSFV)
Género <i>Hepacivirus</i>	
	Virus de la hepatitis C (HCV)

Tabla I.1.- Miembros de la familia *Flaviviridae*. Tabla adaptada de [Lindenbach *et al.*, 2007].

* En la comunidad científica de habla hispana existen discrepancias sobre la correcta traducción del término *West Nile virus* en castellano (“virus West Nile” [Jimenez-Clavero, 2009; Tenorio *et al.*, 2009], “virus del Oeste del Nilo” [Fernandez-Salas *et al.*, 2007; Vallés and Sánchez, 2000], “virus del Nilo Occidental” [Saiz, 2009]), por este motivo, en esta memoria de Tesis Doctoral se ha decidido utilizar la designación oficial adoptada por el Comité Internacional de Taxonomía de virus: *West Nile virus* (WNV).

I.1.1.1.- Filogenia

Estudios filogenéticos basados en secuencias completas o parciales del genoma han mostrado la existencia de dos linajes principales para los aislados del WNV. El linaje 1 se extiende por Norte América, el Norte de África, Europa, Oriente Medio y Australia; el linaje 2 es endémico del sur de África y Madagascar [Burt *et al.*, 2002; Lanciotti *et al.*, 1999]. Recientemente, se han descrito linajes adicionales en Europa central y del este (linajes 3 y 4) [Bakonyi *et al.*, 2005; Lvov *et al.*, 2004], y la India (linaje 5) [Bondre *et al.*, 2007].

I.1.1.2.- Epidemiología

El WNV es un arbovirus transmitido por mosquitos, generalmente del género *Culex*, y su reservorio vertebrado principal son las aves. Sin embargo, los mosquitos también pueden infectar muchas clases de mamíferos como humanos y caballos, así como anfibios y reptiles. Aunque se creía que esta infección era una vía muerta para la transmisión del virus debido a que no parece generar niveles de viremia de suficiente título para contribuir a la transmisión, un estudio ha demostrado una transmisión no-virémica del WNV entre mosquitos que se alimentaban del mismo ratón [Higgs *et al.*, 2005]. En este estudio, los mosquitos sanos se infectaron con el virus alimentándose de un ratón sin viremia detectable del que también se alimentaban mosquitos infectados.

Aunque la mayoría de las infecciones humanas por WNV ocurren tras la picadura de un mosquito infectado, otros factores de riesgo incluyen las transfusiones sanguíneas y transplante de órganos de donantes infectados; transmisión intrauterina y lactancia a través de la madre infectada; y la exposición ocupacional al virus (revisado en [Hayes *et al.*, 2005]).

La epidemiología del WNV está cambiando continuamente. Desde que se aisló por primera vez en Uganda en el año 1937 [Smithburn *et al.*, 1940], este virus ha sido responsable de varios casos esporádicos y brotes importantes en humanos y equinos de varios países del mundo. Sin embargo, el WNV no fue considerado un problema de salud pública en Europa y cuenca del Mediterráneo hasta el brote en Rumanía en 1996, y en América hasta el brote que ocurrió en la ciudad de Nueva York en 1999 con

una inusual mortalidad en pájaros y casos de enfermedades neurológicas severas y muertes en humanos y caballos [Dauphin et al., 2004].

I.1.1.3.- Situación en España

Varias características hacen de España un lugar propicio para la introducción y expansión del WNV: la presencia de humedales por toda la geografía, una población de mosquitos *Culex* estable, la localización geográfica estratégica para numerosas aves migratorias que proceden de África y brotes recientes en animales y humanos de países cercanos [Bernabeu-Wittel et al., 2007].

Varios estudios han confirmado la exposición tanto de animales como de personas al WNV en nuestro país. Algunas especies de animales en las que se confirmó la exposición al WNV son caballos, aves acuáticas y águila imperial [Figuerola et al., 2007; Hofle et al., 2008; Jimenez-Clavero et al., 2007]. Estudios de seroprevalencia también han confirmado la exposición a WNV en personas de áreas del sur y del noreste de España [Bernabeu-Wittel et al., 2007; Bofill et al., 2006]. Pero sólo dos casos de personas que sufrían infección por WNV han sido documentados en España. En el año 2004 fue documentado el primer caso clínico de infección por WNV en un hombre de 21 años que había estado de vacaciones en el suroeste de España [Kaptoul et al., 2007]. En el año 2010 se produjo otro caso en Andalucía donde un hombre de 60 años fue ingresado en el Hospital de Puerto Real (Cádiz) con síntomas de meningitis por WNV (EL PAÍS, Sevilla, 26-09-2010).

I.1.1.4.- Manifestaciones clínicas, diagnóstico y tratamiento

La mayoría de las infecciones humanas por WNV son aparentemente asintomáticas [Mostashari et al., 2001]. Aproximadamente un 20% de personas desarrollan los síntomas como un síndrome de carácter leve denominado fiebre del *West Nile* (WNF), un proceso febril y de inicio súbito que puede acompañarse de dolor de cabeza, malestar, mialgias, fatiga, erupción cutánea, linfadenopatía, vómitos y diarrea. Generalmente, estos síntomas persisten durante 3-6 días y en la mayor parte de los casos desaparecen sin dejar efectos permanentes. En uno de cada 150 pacientes, el virus alcanza el sistema nervioso central y da lugar a encefalitis,

meningitis o parálisis flácida aguda. Son especialmente vulnerables frente a la infección grave las personas de edad avanzada (revisado en [Kramer et al., 2007]).

Tras la sospecha de una posible infección por WNV, la confirmación depende de la detección de anticuerpos o del ácido nucleico viral en la sangre o el fluido cerebroespinal (CSF) [Zhang et al., 2009]. Ya que la viremia es relativamente baja, el test de ácidos nucleicos, aunque bastante específico, tiene baja sensibilidad. La detección de IgM de WNV en el suero o CSF es el método más utilizado para la confirmación de diagnóstico [Kapoor et al., 2004; Martin et al., 2004].

Hasta la fecha, no ha sido aprobada ninguna terapia específica para tratar las infecciones por WNV en humanos, por lo que el tratamiento es fundamentalmente sintomático y de soporte. Varios estudios con distintas orientaciones terapéuticas que incluyen la utilización de ribavirina, ácido micofenólico, interferón α (IFN- α), anticuerpos, siRNAs, compuestos *antisense*, péptidos, y otras moléculas, han mostrado resultados en cultivo celular pero ningún ensayo clínico ha sido completado (revisado en [Diamond, 2009]). Tampoco existe ninguna vacuna aprobada por la FDA (*Food and Drug Administration*) para combatir la infección por WNV en humanos hasta la fecha. Sin embargo, hay varias vacunas en ensayo clínico [Rossi et al., 2010]. En el caso de caballos existen dos vacunas disponibles, una vacuna del virus inactivado y otra vacuna recombinante que utiliza el virus canarypox para expresar antígenos (prM y E) del WNV [Chang et al., 2004; Minke et al., 2004].

I.1.2.- EI VIRUS

I.1.2.1.- La partícula viral

El WNV es un virus de RNA con envuelta. La técnica de microscopía electrónica mostró que los viriones del WNV tienen una simetría icosaédrica y un diámetro aproximado de 50 nm. La capa más externa contiene las proteínas de la envuelta (E) y membrana (M) embebidas en una bicapa lipídica, formando la envuelta del virión. Dentro de la envuelta está la nucleocápsida que contiene múltiples copias de la proteína cápsida y el RNA genómico [Mukhopadhyay et al., 2003] (Fig. I.1, panel superior).

I.1.2.2.- El genoma

El genoma viral tiene aproximadamente 11000 nucleótidos de longitud, que comprende una región 5' no traducible (5'UTR), un único marco abierto de lectura y una región 3' no traducible (3'UTR). Presenta una estructura cap tipo 1 ($m^7GpppAm$) en el extremo 5' [Cleaves and Dubin, 1979] y el extremo 3' no está poliadenilado [Wengler, 1981] sino que presenta una estructura secundaria estable [Brinton *et al.*, 1986] (Fig. I.1, panel inferior). El marco abierto de lectura codifica una poliproteína que es procesada por proteasas virales y celulares en tres proteínas estructurales (cápsida [C], premembrana [prM] o membrana [M], y envuelta [E]) y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b y NS5) (Fig. I.1, panel inferior). Las proteínas estructurales están implicadas en la formación de la partícula viral. Las proteínas no estructurales están implicadas en la replicación del RNA viral [Lindenbach *et al.*, 2007], ensamblaje del virión [Kummerer and Rice, 2002; Liu *et al.*, 2003] y evasión de la respuesta innata inmune del hospedador [Liu *et al.*, 2005; Munoz-Jordan *et al.*, 2003].

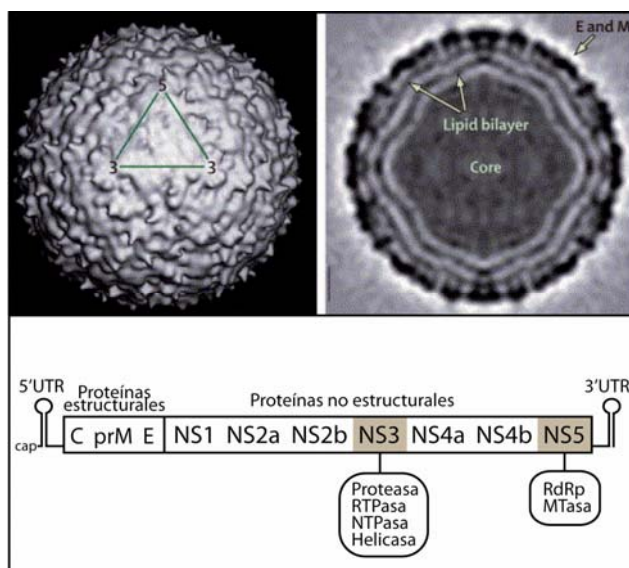


Fig. I.1.- Virión y genoma del WNV. El panel superior muestra imágenes de microscopía crio-electrónica del virión del WNV. El panel inferior muestra la organización genómica del virus. Se indica que la proteína NS3 es una serín proteasa (con NS2b como cofactor), RNA trifosfatasa (RTPasa), nucleósido trifosfatasa (NTPasa) y helicasa. La proteína NS5 es una polimerasa de RNA dependiente de RNA (RdRp) y metiltransferasa (MTasa). Figura adaptada de [Kramer *et al.*, 2007].

I.1.2.3.- Ciclo de replicación

El ciclo de replicación de los flavivirus consiste en cuatro etapas principales: anclaje/entrada, traducción, replicación y ensamblaje/salida. En la figura I.2 se resume esquemáticamente este ciclo.

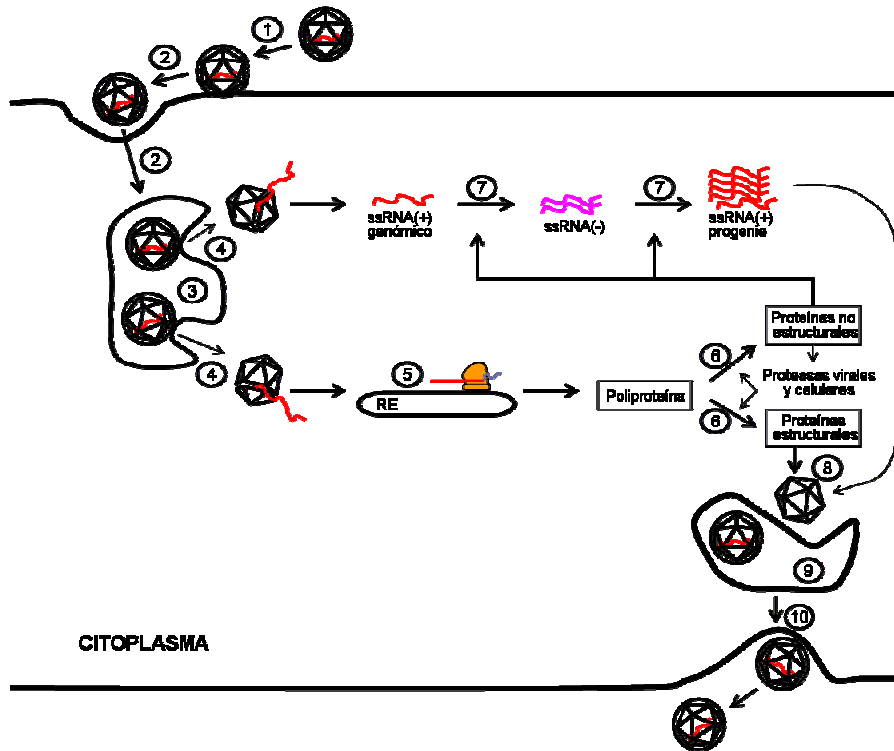


Fig. I.2.- Ciclo de replicación. (1) Interacción de la partícula viral con un receptor o receptores de la célula. (2) Internalización a través de una ruta endocítica dependiente de clatrina [Chu and Ng, 2004]. (3) La acidificación del compartimento endosomal resulta en la fusión de las membranas viral y endosomal y (4) la liberación de la nucleocápsida en el citoplasma [Modis et al., 2004; Mukhopadhyay et al., 2005]. (5) Traducción dependiente de cap en la membrana del retículo endoplasmático (RE). (6) La poliproteína es procesada co y post-traduccionalmente por proteasas virales y celulares. (7) La hebra positiva del RNA genómico “ssRNA(+)” es copiada en la hebra complementaria de polaridad negativa “ssRNA(-)”, la cual sirve como molde para la síntesis de más RNA genómico de polaridad positiva [Chu and Westaway, 1985; Lindenbach et al., 2007]. (8) Ensamblaje de la nucleocápsida. (9) Los viriones maduran a través de la vía de secreción del RE-Golgi y (10) las progenies de virus son liberados por exocitosis.

I.1.2.4.- Regiones terminales del genoma del WNV

Las regiones terminales del genoma del WNV han sido muy estudiadas. Ensayos de determinación de la estructura secundaria del RNA con RNAsas específicas de simple y doble cadena han demostrado que los nucleótidos terminales de los extremos 5' y 3' del genoma del WNV forman estructuras tallo-lazo como las predichas por programas de plegamiento termodinámico [Dong et al., 2008] (Fig. I.3). La región 5'UTR del virus contiene 96 nucleótidos y está altamente conservada en los flavivirus. Contiene dos tallos-lazo (SL1 y SL2) implicados en distintos procesos importantes del ciclo viral. El tallo-lazo SL1 tiene aproximadamente 70 nucleótidos de longitud y es esencial para la replicación viral por su unión con la proteína NS5 [Li et

al., 2010]. Esta interacción NS5/5'SL1 junto con la circularización del genoma podría facilitar la unión de NS5 al extremo 3' del genoma para el inicio de la síntesis de la hebra negativa del RNA [Dong *et al.*, 2008]. El tallo-lazo SL2 contiene el codón de inicio AUG y una región corriente arriba denominada 5'UAR implicada en una interacción a larga distancia con una región presente en el extremo 3' (3'UAR). La conformación de la estructura del tallo-lazo SL2 no es importante para la traducción del WNV [Zhang *et al.*, 2008]. El primer tallo-lazo tras el codón de inicio de la traducción (SL3 o elemento CHP) es requerido para la síntesis de RNA del WNV [Clyde *et al.*, 2008].

Los últimos 96 nucleótidos de la región 3'UTR forman dos estructuras tallo-lazo adyacentes, las cuales se unen a proteínas de replicación virales y celulares y parecen funcionar como un promotor para la síntesis de la hebra negativa [Davis *et al.*, 2007]. La existencia de un gran tallo-lazo formado por los últimos 79 nucleótidos en la región 3' del WNV fue confirmado previamente por Brinton *et al.* [Brinton *et al.*, 1986]. En este tallo-lazo se encuentra el elemento de secuencia denominado 3'UAR implicado en una interacción a larga distancia con la región 5'. Se ha encontrado un *pseudoknot* entre las dos estructuras tallo-lazo del extremo 3' que podría jugar un papel importante en el reconocimiento de dicho extremo por proteínas virales y celulares durante el inicio de la replicación viral [Shi *et al.*, 1996].

La circularización del genoma de los flavivirus es esencial para la replicación viral. Tres interacciones a larga distancia permiten la circularización del RNA genómico del WNV: 5'UAR/3'UAR (*upstream AUG region*), 5'CS/3'CSI (*conserved sequence*) y 5'DAR/3'DAR (*downstream AUG region*) (Fig. 1.3). La interacción 5'UAR/3'UAR ya ha sido comentada anteriormente. La segunda interacción 5'CS/3'CSI está mediada por el apareamiento del elemento de secuencia conservado 5'CS que se localiza en la región N-terminal del gen de la cápsida y el elemento 3'CSI localizado en la región 3'UTR. La interacción 5'DAR/3'DAR se produce por unas secuencias situadas corriente abajo del codón de inicio de la traducción y, según análisis de secuencia para el WNV, consta de las interacciones 5'DARI/3'DARI y 5'DARII/3'DARII [Zhang *et al.*, 2010]. La circularización del genoma conlleva un cambio conformacional que deja algunos de los nucleótidos 3' terminales del RNA genómico como simple cadena [Dong *et al.*, 2008].

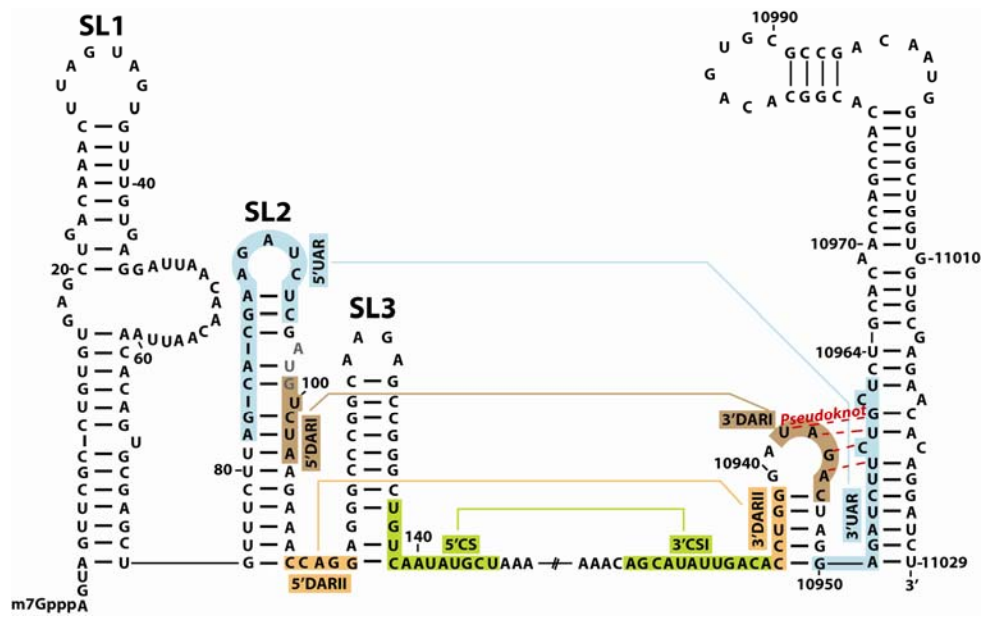


Fig. I.3.- Estructuras tallo-lazo terminales e interacciones a larga distancia en el genoma del WNV. Se muestra la estructura secundaria que adopta la secuencia de nucleótidos de la región 5' y 3' del genoma del WNV según el programa *mfold*. Las secuencias de nucleótidos implicadas en las interacciones a larga distancia 5'CS/3'CSI, 5'UAR/3'UAR, 5'DARI/3'DARI y 5'DARII/3'DARII se marcan en color verde, azul, marrón y naranja respectivamente; su interacción se representa con una línea del mismo color. Las interacciones implicadas en el *pseudoknot* de la región 3' se representan con líneas discontinuas rojas. El codón de inicio AUG se indica en color gris. Figura adaptada de [Zhang *et al.*, 2010].

I.2.- MIMETISMO MOLECULAR

El **mimetismo** (del griego μιμητός, imitable) es una habilidad que ciertos seres vivos poseen para asemejarse a otros de su entorno (con los que no guarda relación) y a su propio entorno para obtener alguna ventaja funcional. Los casos más conocidos afectan a la percepción *visual*, pero también hay ejemplos de mimetismo *auditivo*, *olfativo* o *táctil*. Esta estrategia no sólo queda restringida a animales y plantas sino que se da también a nivel molecular y en este contexto se denomina mimetismo molecular. El mimetismo molecular debe ser un mecanismo antiguo que probablemente se originó en el mundo RNA donde estructuras tridimensionales específicas conferirían funciones únicas a diferentes RNAs [Nakamura, 2001]. El mimetismo molecular ha evolucionado por diferentes razones. Una es el obvio beneficio de supervivencia en casos donde los patógenos usan el mimetismo molecular para engañar las defensas del hospedador. Otra razón debe ser la adquisición de funciones más eficientes. Y otra razón importante es la competición en la regulación génica [Tsonis and Dwivedi, 2008]. El término mimetismo molecular se ha empleado especialmente en el campo de la biología molecular de los virus RNA y en la inmunología.

En el caso del RNA, el mimetismo está relacionado con la estructura secundaria y terciaria que adopta la molécula, pues es la estructura la que determina muchas de sus funciones biológicas. Se puede aplicar el término mimetismo para aquellos casos donde la estructura de una molécula de RNA ha evolucionado para interactuar con una proteína o complejo macromolecular que normalmente interactúa con un RNA o molécula biológica diferente [Springer et al., 1998].

Uno de los ejemplos más conocidos de mimetismo del RNA son las estructuras tipo tRNA (TLS). Estas estructuras, que mimetizan propiedades estructurales de los tRNAs, han sido encontradas en el extremo 3' de muchos RNAs genómicos de virus de plantas (Fig. I.4). La primera estructura tipo tRNA identificada en un genoma viral fue en el extremo 3' del genoma del *turnip yellow mosaic virus* (TYMV) tras demostrarse que la valina podía ser unida covalentemente al extremo 3' del RNA viral por una reacción catalizada por la valina-tRNA sintetasa (ValRS) [Pinck et al., 1970; Yot et al., 1970]. El mimetismo del tRNA no solo se restringe a la aminoacilación, también concierne la interacción del RNA viral con otras proteínas como factores de elongación [Joshi et al., 1986; Litvak et al., 1973], tRNA nucleotidil-transferasa [Litvak et al., 1973] y RNasa P [Prochiantz and Haenni, 1973].

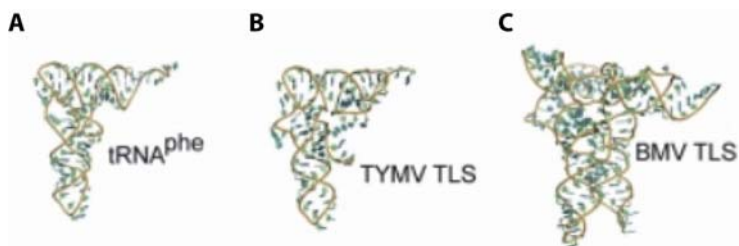


Fig. I.4.- Estructura cristalina del tRNA^{Phe} **(A)** y modelos de estructura para el *turnip yellow mosaic virus* (TYMV) **(B)** y *brome mosaic virus* (BMV) **(C)**. Figura adaptada de [Hammond *et al.*, 2009].

Recientemente, la RNasa P humana ha permitido encontrar *in vitro* una estructura tipo tRNA en el IRES del virus de la hepatitis C (HCV) [Nadal *et al.*, 2002] y otros IRES de virus relacionados como el virus de la peste porcina clásica (CSFV) y el virus de la diarrea viral bovina (BVDV); y de virus no relacionados como el virus de la encefalomiocarditis y el virus de la parálisis del grillo [Lyons and Robertson, 2003]. La utilización de la subunidad de RNA de la RNasa P de la cianobacteria *Synechocystis* sp. ha permitido corroborar la existencia de la estructura tipo tRNA en el IRES de HCV [Sabariegos *et al.*, 2004], y también ha permitido reconocer un motivo localizado en la región apical del dominio central del IRES del virus de la enfermedad de pie y boca (FMDV) [Serrano *et al.*, 2007].

Otra estrategia mimética, propuesta por algunos grupos, se establece cuando un RNA mimetiza los requerimientos estructurales necesarios para ser reconocidos por algunas enzimas con motivos de unión a RNA de doble cadena como la RNasa III y la proteína quinasa dependiente de RNA (PKR) [Circle *et al.*, 1997; Robertson, 1982]. Es el caso, por ejemplo, de RNAs con estructuras secundarias complejas que mediante dimerización o apilamiento coaxial de hélices cortas mimetizan un RNA de doble cadena con un mínimo de 33 pares de bases necesarias para ser reconocido por la PKR [Bevilacqua *et al.*, 1998; Cohen-Chalamish *et al.*, 2009; Heinicke *et al.*, 2009]. O el caso del dominio II del IRES del HCV que, a pesar de que consiste en varias bases apareadas interrumpidas por lazos internos y burbujas, parece adoptar la conformación A de la hélice de un dsRNA perfecto que imita los requerimientos de la PKR [Toroney *et al.*, 2010] (Fig. I.5).

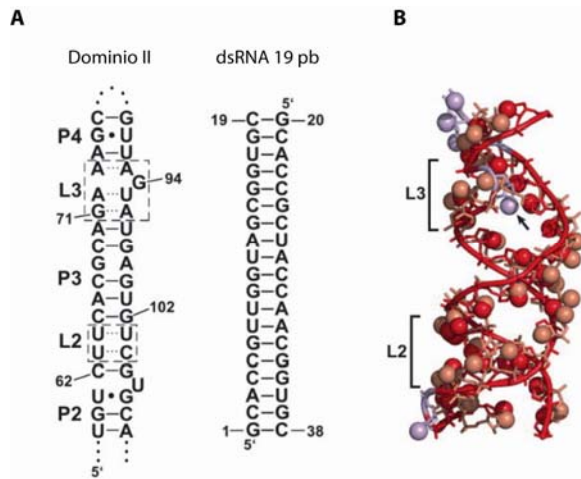


Fig. 1.5.- Comparación estructural del dominio II del IRES de HCV con un dsRNA de 19 pares de bases. (A) Estructura secundaria del dominio II que comprende los nucleótidos 59 al 109 en la secuencia del HCV, y de un dsRNA de 19 pares de bases. Las regiones apareadas en el dominio II se indican como P2, P3 y P4.

Las regiones desapareadas correspondientes a los lazos internos se indican como L2 y L3, y se enmarcan con un recuadro. **(B)** Modelo estructural del puente azúcar-fosfato de (A). Los

residuos del dominio II se representan en color rojo y los del dsRNA de 19 pares de bases en marrón. Los grupos 2'-hidroxilo se representan mediante esferas. Los corchetes indican la posición del lazo L2 y L3, y la flecha indica el 2'-hidroxilo de la posición G94 del dominio II. Los nucleótidos 59-73, 95-105 y 107-109 se ajustaron a los nucleótidos 1-15, 24-34 y 36-38, respectivamente; y los nucleótidos 90-93, a los nucleótidos 19-17 y 23 de la conformación A de la hélice. Los nucleótidos del dominio II que no encajan en el modelo de estructura (A74, G75, C76, G94 y U106) se muestran en color morado. Los nucleótidos 20 y 21 del dsRNA de 19 pares de bases no se muestran. Figura adaptada de [Toroney *et al.*, 2010].

La utilización de la RNasa III de *E. coli* como herramienta de análisis del RNA ha permitido el descubrimiento de una interacción a larga distancia que flanquea el IRES de HCV. Varios nucleótidos de la región de simple cadena situada entre el dominio I y II, y del dominio VI interaccionan formando una región de doble cadena que es reconocida y procesada por esta ribonucleasa [Beguiristain *et al.*, 2005].

En este trabajo se han buscado motivos estructurales en los primeros 702 nucleótidos del genoma del WNV que mimetizan los requerimientos necesarios para el reconocimiento de varios enzimas miembros de la familia de la RNasa III y RNasa P, a los cuales nos referiremos como dominios tipo RNA de doble cadena y tRNA respectivamente, a lo largo de esta memoria. Estas ribonucleasas son específicas de estructura secundaria y terciaria del RNA, y en los próximos capítulos de la Introducción se profundizará más en cada una de ellas.

I.3.- RNasa III

Los miembros de la familia ribonucleasa III (RNasa III) son endoribonucleasas específicas de RNA de doble cadena (dsRNA). Todos los miembros de esta familia contienen un dominio ribonucleasa característico que se denomina comúnmente “dominio RNasa III” [MacRae and Doudna, 2007]. Esta familia se ha subdividido en tres clases diferenciadas en base a sus dominios [Blaszczyk et al., 2001; Lamontagne et al., 2001]:

- Clase I: Contienen un único dominio ribonucleasa y un dominio de unión a dsRNA (dsRBD). Representada por la RNasa III de *Escherichia coli*, es la más estudiada y mejor caracterizada de la familia RNasa III.
- Clase II: Contienen un dsRBD y dos dominios ribonucleasa, los cuales son comúnmente denominados como RNasa IIIa y IIIb. La clase 2 de la familia RNasa III está representada por Drosha.
- Clase III: Típicamente contienen dos dominios ribonucleasa, un dsRBD y un dominio N-terminal RNA helicasa/ATPasa seguido por un pequeño dominio de función desconocida denominado DUF283 (*Domain of Unknown Function 283*) y un dominio PAZ (*Piwi Argonaute Zwillle*). La clase 3 de la familia RNasa III es también conocida como la familia de enzimas Dicer [Bernstein et al., 2001].

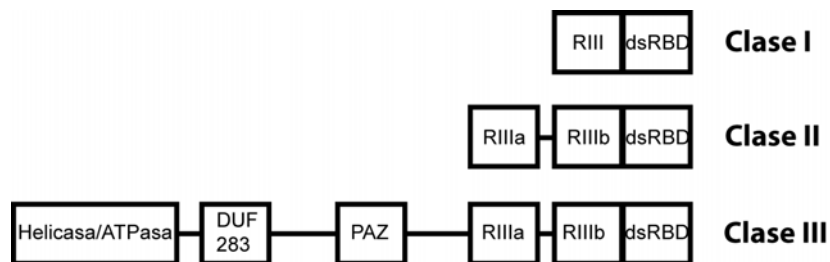


Fig. I.6.- Representación esquemática de los dominios que constituyen cada clase de la familia RNasa III. RIII: dominio ribonucleasa; dsRBD: dominio de unión a dsRNA; Helicasa/ATPasa: dominio RNA helicasa/ATPasa; DUF283: *Domain of Unknown Function 283*; PAZ: dominio *Piwi Argonaute Zwillle*.

Los miembros de la familia RNasa III son fosfodiesterasas y requieren un ión metálico divalente para hidrolizar los puentes fosfodiéster, dejando productos con extremos 5'-fosfato y 3'-hidroxilo con dos nucleótidos 3' protuberantes en la doble hebra cortada [MacRae and Doudna, 2007; Robertson and Dunn, 1975].

I.3.1.- RNasa III de *Escherichia coli*

La RNasa III de *Escherichia coli* (Ec-RNasa III) fue detectada por primera vez en el año 1967 por Eladio Viñuela y Charles Weissmann (resultados sin publicar), y por Robertson *et al.* [Robertson *et al.*, 1967] como una enzima que digería específicamente dsRNA; y fue purificada en el año 1968 [Robertson *et al.*, 1968]. Todos los genomas bacterianos caracterizados contienen un gen para la RNasa III. Esta conservación sugiere que esta ribonucleasa debe estar implicada en una o más funciones celulares de importancia fundamental [Nicholson, 2003]. La Ec-RNasa III juega un papel clave en la maduración y degradación de diversos RNAs celulares y virales. Está implicada en la maduración de los RNAs ribosomales (rRNAs) siendo la responsable de cortar el transcrito primario rRNA 30S para dar lugar a los precursores inmediatos del rRNA 16S, 23S y 5S [Srivastava and Schlessinger, 1990] (Fig. I.7.A). También está implicada en la maduración de mRNAs. La RNasa III lleva a cabo el procesamiento de cinco regiones intercistricas del precursor temprano del mRNA policistrico del bacteriófago T7 (Fig. I.7.B) proporcionando especies maduras. Esta acción es importante para la traducción óptima de varios de esos mRNAs [Dunn and Studier, 1983]. Pero la acción de esta ribonucleasa también puede iniciar la degradación de algunos mRNAs. El corte en sitios específicos de la región 5' no traducible (5'UTR) del mRNA de la polinucleótido fosforilasa (PNPasa) promueve su rápida degradación por otras ribonucleasas [Jarrige *et al.*, 2001]. La RNasa III también autorregula su producción a través de sitios específicos de corte en la región 5'UTR de su mRNA que promueven su degradación (Fig. I.7.C) [Bardwell *et al.*, 1989; Matsunaga *et al.*, 1996; 1997].

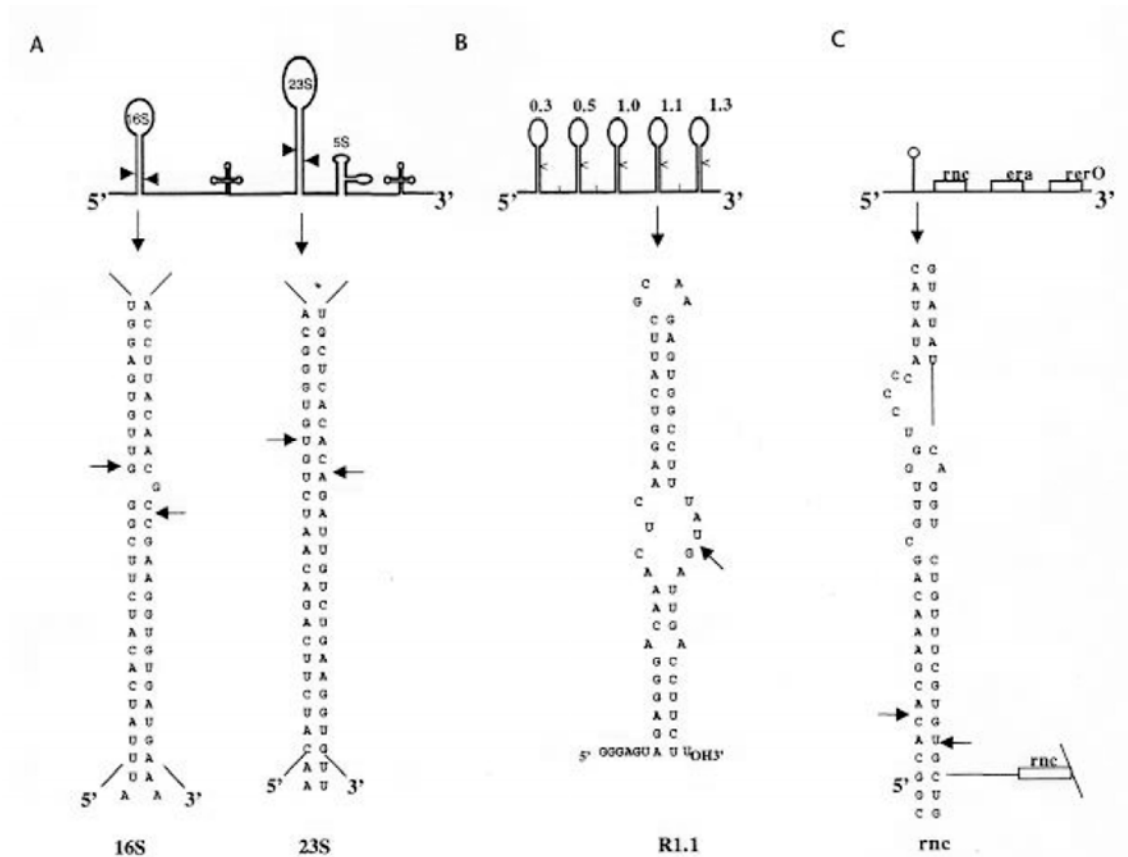


Fig. I.7.- Ejemplos de algunos sustratos para la Ec-RNasa III. (A) El precursor rRNA 30S es procesado por la Ec-RNasa III. Se muestra la secuencia de corte para el rRNA 16S y 23S; y los cortes se indican mediante flechas. (B) El precursor temprano del mRNA policistrónico del bacteriófago T7 es procesado por la Ec-RNasa III en cinco regiones intercistricas. Se muestra la secuencia de un fragmento del transcrito correspondiente al gen 1.1 (R1.1) y el sitio de corte en dicho RNA se indica con una flecha. (C) En el panel superior de la figura se muestra el operón *rnc* de *E. coli* con sus tres genes multifuncionales *rnc*, *era* y *rerO*. La RNasa III es codificada por el gen *rnc*. En el panel inferior se muestra parte de la estructura de la región 5' del mRNA de la RNasa III y mediante flechas se indican los cortes que produce dicha ribonucleasa en esta región. Figura tomada de [Nicholson, 2003].

La Ec-RNasa III pertenece a la clase I de la familia RNasa III. Presenta un dominio ribonucleasa en el extremo N-terminal y un dominio de unión a dsRNA (dsRBD) en el extremo C-terminal (Fig. I.6, clase I). Funciona como un homodímero cuya dimerización ocurre a través de los dominios ribonucleasa. Los dos dominios ribonucleasa se combinan para formar un único centro de procesamiento con cada dominio contribuyendo a la hidrólisis de una hebra de RNA del sustrato dúplex que genera productos con 2 nucleótidos 3' protuberantes [Zhang *et al.*, 2004] (Fig. I.8).

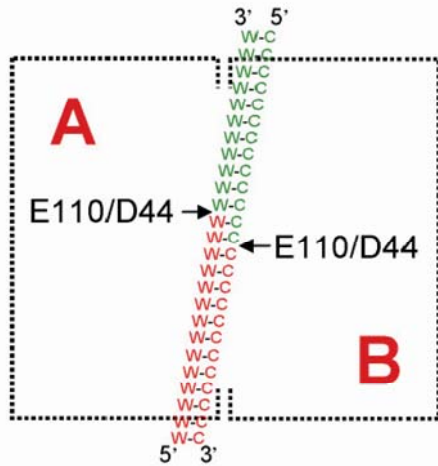


Fig. I.8.- Modelo de corte para la Ec-RNasa III propuesto por Zhang *et al.* [Zhang *et al.*, 2004]. A y B representan las dos subunidades del homodímero. Los residuos E110 y D44 de cada centro catalítico son los responsables de la generación de los productos con 2 nucleótidos 3' protuberantes. Figura tomada de [Zhang *et al.*, 2004].

Una cuestión desconcertante ha sido cómo esta ribonucleasa selecciona su sitio de corte. Los sitios de corte de los sustratos para la RNasa III bacteriana son determinados por elementos estructurales y de secuencia del RNA, también denominados “epítopos reactivos”. La longitud de la hélice es un epítipo reactivo primario, los sustratos de la Ec-RNasa III normalmente exhiben dos vueltas de hélice de dsRNA [Robertson, 1982]. El apilamiento coaxial de hélices cortas puede proporcionar una hélice casi continua de suficiente longitud para permitir el corte. Es lo que ocurre en el caso del sistema de RNAs *hok/sok* del plásmido R1 de *E. coli* [Franch *et al.*, 1999] (Fig. I.9.A). La interacción del RNA Sok con el mRNA *hok* provoca el corte por la Ec-RNasa III que impide la traducción del último. Otro epítipo reactivo basado en estructura incluye lazos internos. Aunque la reacción estándar implica el corte de ambas hebras del dsRNA, la presencia de un lazo interno puede dirigir el corte de un único fosfodiéster [Robertson, 1982]. Este tipo de corte proporciona estructuras tallo-lazo en el extremo 3' que contribuyen a su estabilidad química bloqueando la acción de exoribonucleasas 3'-5' [Panayotatos and Truong, 1985]. Un estudio ha mostrado que la asimetría y tamaño del lazo interno más que la secuencia, son los determinantes primarios de la especificidad del corte del sitio único [Calin-Jageman and Nicholson, 2003a]. Un motivo *bulge*-hélice-*bulge* puede permitir la unión de la Ec-RNasa III pero inhibir el corte actuando como “antideterminante catalítico” [Calin-Jageman and Nicholson, 2003b]. La secuencia de pares de bases también participa controlando la reactividad del sustrato y puede también dirigir la selección del sitio diana. Un estudio realizado con diferentes variantes del RNA R1.1 propuso que la RNasa III reconocía su sustrato mediante la unión a dos regiones específicas de apareamiento Watson-Crick denominadas caja proximal (pb) y caja distal (db) (Fig. I.9.B), y que la unión de la ribonucleasa era inhibida por la presencia de

apareamientos Watson-Crick desfavorables (antideterminantes) en dichas cajas [Zhang and Nicholson, 1997]. Este mecanismo de selección del sitio de corte no implica determinantes de reconocimiento de secuencias positivas. Sin embargo, otro estudio posterior llevado a cabo por el mismo grupo [Pertzev and Nicholson, 2006] mostró que pares de bases específicas funcionan como determinantes de reconocimiento positivo. Así, elementos positivos y negativos (antideterminantes) cooperan para identificar el sitio de corte y controlan la reactividad de la Ec-RNasa III.

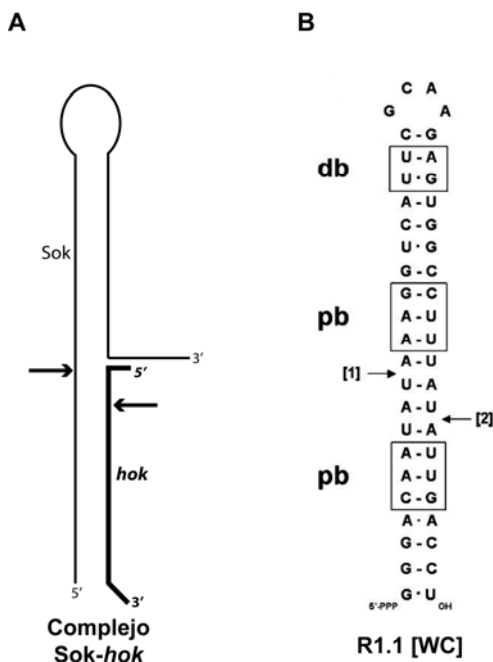


Fig. I.9.- Ejemplos de epítomos reactivos de la Ec-RNasa III. (A) Apilamiento coaxial en la interacción del RNA Sok-mRNA *hok*. Mediante flechas se indican los sitios de corte. Figura adaptada de [Nicholson, 2003]. **(B)** Secuencia y estructura secundaria de una de las variantes del RNA R1.1 donde se indican las cajas proximal (pb) y distal (dp), y los sitios de corte se señalan mediante flechas. Figura tomada de [Pertzev and Nicholson, 2006].

Varios estudios sobre la influencia de la fuerza iónica en la especificidad de corte de la RNasa III de *E. coli* han mostrado que los sitios de corte primarios son aquellos donde el corte se lleva a cabo *in vivo* y son reconocidos por la ribonucleasa en presencia de magnesio (Mg^{2+}) y una relativamente alta concentración de sal monovalente (0'15-0'3M) *in vitro*. Una concentración más baja de sal monovalente y/o reemplazando Mg^{2+} por Mn^{2+} promueve el corte de sitios adicionales (secundarios) *in vitro* que no son reconocidos normalmente *in vivo*. Esta característica podría ayudar a determinar la probabilidad de que un corte de la RNasa III observado *in vitro* pueda ocurrir *in vivo* [Dunn, 1976; Gross and Dunn, 1987].

I.3.2.- RNasa III DICER

La ribonucleasa Dicer es un miembro de la familia RNasa III de clase III. Dicer se ha encontrado en todos los eucariotas estudiados hasta la fecha, con la excepción de *Sacharomyces cerevisiae*. El número de genes que codifica proteínas tipo Dicer varía de uno a cuatro según el organismo. Gusanos y vertebrados codifican una única proteína Dicer; *Drosophila* codifica dos, Dicer-1 (implicada en el procesamiento de los pre-miRNAs) y Dicer-2 (implicada en el procesamiento de los dsRNAs exógenos) [Hammond, 2005]; y *Arabidopsis thaliana* codifica cuatro proteínas tipo Dicer (DCL1 a DCL4). En plantas, DCL1, DCL3 y DL4 se localizan en el núcleo de acuerdo con el papel nuclear de estas proteínas [Hiraguri et al., 2005; Xie et al., 2004]. En la levadura *Schizosaccharomyces pombe* Dcr1 se ha encontrado también en el núcleo [Emmerth et al., 2010]. En células de mamífero Dicer ha sido localizada en el citoplasma [Billy et al., 2001; Provost et al., 2002].

Dicer es una enzima clave en el proceso de interferencia de RNA (RNAi). En humanos, Dicer es responsable del procesamiento de precursores tallo-lazo conocidos como pre-microRNAs a microRNAs (miRNAs) maduros [Hutvagner et al., 2001] y del RNA de doble cadena (dsRNA) a RNAs interferentes pequeños (siRNAs) [Elbashir et al., 2001]. En la figura I.10 se muestra un esquema que resume la ruta de interferencia de RNA en humanos.

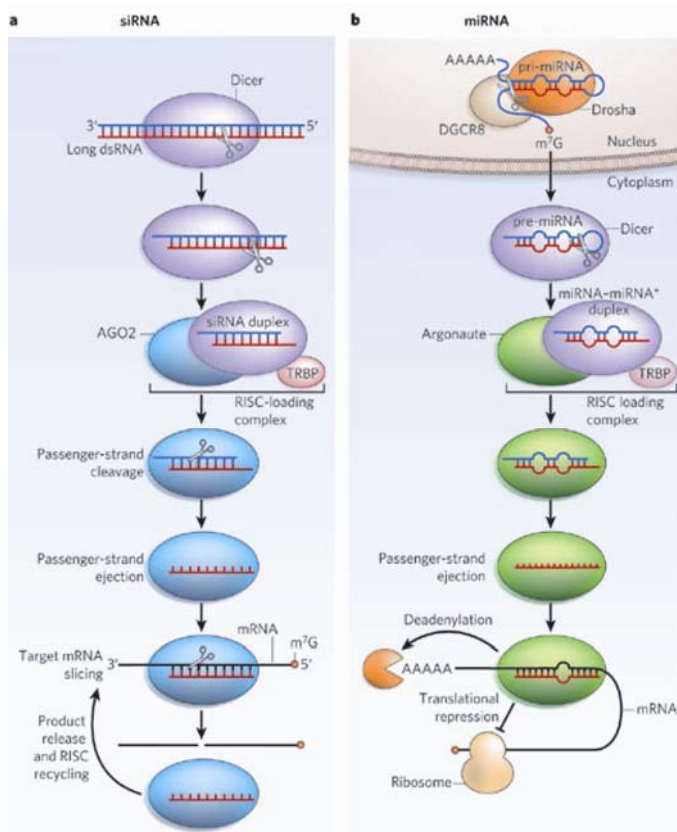


Fig. I.10.- (A) Los siRNAs derivan principalmente de largas moléculas de dsRNA exógenas. Dicer procesa estos dsRNA para producir dúplex de ~21-25 nucleótidos (siRNAs). El siRNA es incorporado al complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC), un complejo formado por una proteína Argonaute, Dicer y una

proteína de unión al dsRNA conocida como TRBP en humanos. Para simplificar, en la figura, el RISC se representa sólo por la proteína Argonauta AGO2. Una de las hebras del dúplex se asocia por complementariedad con su RNA diana produciendo su degradación. **(B)** Los miRNAs se transcriben a partir de genes endógenos como transcritos primarios (pri-miRNAs) de estructura tallo-lazo que contiene ~65-70 nucleótidos. Este pri-miRNA es procesado en el núcleo por Drosha para producir el precursor del miRNA (pre-miRNA). Este pre-miRNA es exportado al citoplasma donde Dicer lo procesa para dar lugar al miRNA maduro. El miRNA incorporado al RISC regula la traducción de los mRNAs diana. Figura tomada de [Jinek and Doudna, 2009].

In vitro, la RNasa Dicer humana es mucho más rápida procesando sustratos pre-miRNA que sustratos pre-siRNA bajo condiciones de “*single turnover*” (en las que la enzima se encuentra en exceso molar) y de “*multiple turnover*” (en la que el sustrato se utiliza en exceso molar), siendo prácticamente incapaz de procesar el pre-siRNA frente al pre-miRNA en las mismas condiciones de “*multiple turnover*” [Chakravarthy *et al.*, 2010].

En humanos, Dicer es una gran proteína de 220 kDa que además de dos dominios tipo RNasa III (RIIIa y RIIIb) y un dominio de unión a dsRNA (dsRBD) en el extremo C-terminal, tiene un dominio N-terminal RNA helicasa/ATPasa seguido por un pequeño dominio de función desconocida (DUF283) y un dominio PAZ (Fig. I.6, clase III). Los dos dominios ribonucleasa funcionan como un dímero intramolecular y forman un único centro de procesamiento de dsRNA. Cada dominio contribuye a la hidrólisis de una hebra del dsRNA que genera productos con 2 nucleótidos 3' protuberantes [Zhang *et al.*, 2004] (Fig. I.11.A). La estructura cristalina de la ribonucleasa Dicer de *Giardia intestinalis* mostró que los 2 nucleótidos 3' protuberantes del sustrato se localizan en el bolsillo hidrofóbico del dominio PAZ y los 65 Å de distancia que existen entre el sitio activo del dominio RIIIa al bolsillo del dominio PAZ coincide con la longitud de 25 pares de bases de dsRNA propio de los fragmentos de RNA producidos por Dicer *Giardia* [Macrae *et al.*, 2006] (Fig. I.11.B). En humanos, Dicer produce dsRNAs de 21-23 nucleótidos de longitud, por lo que esta distancia es probablemente más corta, sugiriendo que la ribonucleasa Dicer humana puede tener un conector de hélice más corto [MacRae and Doudna, 2007].

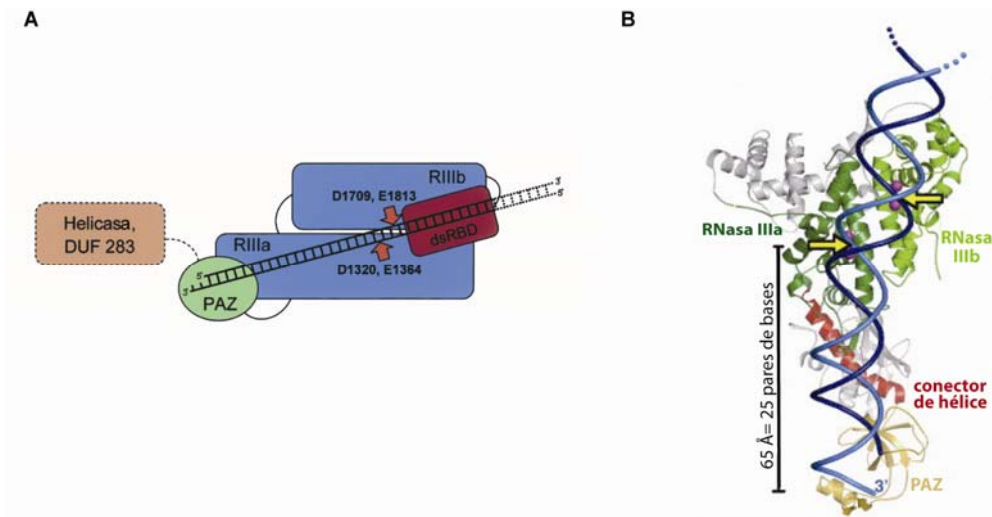


Fig. I.11.- Modelo de corte para Dicer. (A) Modelo de procesamiento del dsRNA por Dicer según Zhang *et al.* [Zhang *et al.*, 2004]. Los dos dominios RNasa III (RIIIa y RIIIb) funcionan como un dímero intramolecular y forman un único centro de procesamiento del dsRNA. Cada dominio de Dicer se representa en un color diferente. Los cortes en el RNA se indican mediante flechas. Figura adaptada de [Zhang *et al.*, 2004]. **(B)** Representación de Dicer *Giardia* con el dsRNA. Las flechas amarillas indican los sitios de corte en el RNA. Los iones metálicos del centro activo se representan como esferas moradas. La distancia entre el extremo 3' del dsRNA unido al dominio PAZ y el sitio activo del dominio RIIIa (65 Å) determina la longitud del RNA producto (25 pares de bases). Figura adaptada de [MacRae and Doudna, 2007].

Sin embargo, como se demuestra en el trabajo de Zhang *et al.* del 2002 [Zhang *et al.*, 2002], Dicer es capaz también de iniciar el proceso, aunque menos efectivo, en sitios internos del sustrato de dsRNA.

Varios estudios sugieren que una o más enzimas tipo Dicer codificadas en plantas son capaces de reconocer dúplex imperfectos en RNAs virales y procesarlos en pequeños RNAs como en el caso del *Cymbidium ringspot virus* (CymRSV) [Molnar *et al.*, 2005] y del RNA satélite del *Cucumber mosaic virus* (CMV-satRNA) [Du *et al.*, 2007]. Virus humanos tales como *Epstein-Barr virus* (EBV) [Pfeffer *et al.*, 2004], *human cytomegalovirus* (HCMV) [Pfeffer *et al.*, 2005] o *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus* (KSHV) [Cai *et al.*, 2005; Pfeffer *et al.*, 2005] también albergan estructuras secundarias tallo-lazo que representan una fuente de miRNAs. Otro estudio más reciente ha demostrado que el elemento TAR del HIV-1, que se pliega formando una estructura tallo-lazo en la región 5' de los mRNAs de este virus, representa una fuente de miRNAs implicados en el proceso de silenciamiento de RNA [Ouellet *et al.*, 2008].

I.4.- RNasa P

La ribonucleasa P (RNasa P) fue descubierta en extractos de *Escherichia coli* en el año 1972 [Robertson et al., 1972] y, posteriormente, en las células de los tres dominios de la vida (Bacteria, Archaea y Eukarya) [Walker and Engelke, 2006]. El principal papel biológico de esta ribonucleasa es la maduración del extremo 5' de los precursores de los RNAs de transferencia (pre-tRNAs) (Fig. I.12). La RNasa P cataliza la hidrólisis de un puente fosfodiéster generando productos con extremos 5'-fosfato y 3'-hidroxilo, y su actividad es dependiente de cationes divalentes [Guerrier-Takada et al., 1983].

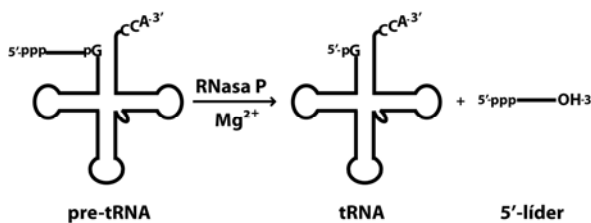


Fig. I.12.- Maduración del extremo 5' del pre-tRNA. En presencia de cationes divalentes (Mg^{2+}), la RNasa P cataliza la hidrólisis de un puente fosfodiéster en el pre-tRNA liberando la secuencia 5'-líder y generando tRNAs con extremos 5' maduros. Los nuevos extremos

generados tras el corte por la RNasa P son extremos 5'-fosfato y 3'-hidroxilo. Figura adaptada de [Vioque and Altman, 2001].

La RNasa P es una ribonucleoproteína que consiste en una única subunidad de RNA y una o más proteínas. Aunque el componente proteico no es necesario para el corte del RNA *in vitro*, ambos componentes son esenciales *in vivo* [Mann et al., 2003]. La composición proteica de la RNasa P difiere entre bacterias (una sola proteína), arqueas (4 o 5 subunidades proteicas diferentes) y eucariotas (hasta 10 componentes proteicos diferentes) [Hartmann and Hartmann, 2003].

El descubrimiento de que el componente RNA de la RNasa P bacteriana de *E. coli* y *B. subtilis* [Guerrier-Takada et al., 1983], de algunos arqueas [Pannucci et al., 1999] y de la RNasa P eucariota de humanos y *Giardia lamblia* [Kikovska et al., 2007] presenta actividad catalítica en ausencia de proteína bajo condiciones específicas *in vitro*, ha hecho que la RNasa P sea considerada como un ribozima. Aunque actualmente se han encontrado algunas excepciones donde la RNasa P basada en RNA ha sido reemplazada por enzimas basadas en proteínas, como en cloroplastos de espinacas [Thomas et al., 2000], mitocondria humana [Holzmann et al., 2008] y, más recientemente, en la mitocondria y cloroplastos de *Arabidopsis thaliana* [Gobert et al., 2010].

La RNasa P puede cortar variedad de sustratos, y el pre-tRNA es un sustrato común entre todos los organismos. Se ha publicado recientemente un trabajo con la estructura cristalina de la holoenzima RNasa P de *Thermotoga maritima* en complejo con el tRNA^{Phe} [Reiter et al., 2010] (Fig. I.13.C). Las interacciones encontradas en este complejo coinciden con lo descrito en estudios bioquímicos previos. La estructura del complejo muestra que el reconocimiento del tRNA por la RNasa P incluye los lazos D y TψC en el tRNA, y las regiones conservadas CR-II y CR-III en el dominio S del RNA de la RNasa P. Estas regiones presentan secuencias y estructuras altamente conservadas y sugiere un modo de reconocimiento universal en todas las RNasas P. Además de los lazos D y TψC, existen otras interacciones con el tallo aceptor y el extremo 3' del tRNA. El reconocimiento RNA-RNA ocurre a través de complementariedad de formas, contactos intermoleculares e interacciones de pares de bases. La estructura del complejo indica además que la RNasa P presenta un mecanismo catalítico con al menos dos iones metálicos.

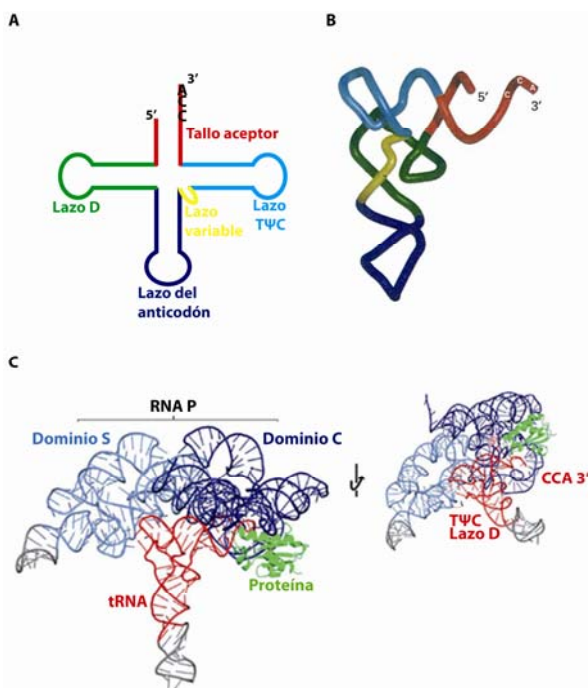
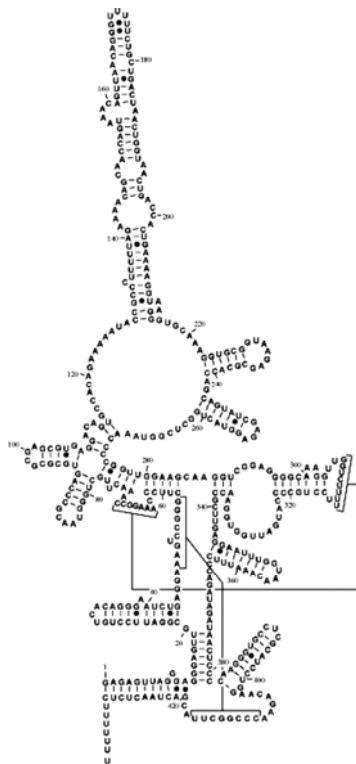


Fig. I.13.- Estructura del tRNA y del complejo RNasa P-tRNA. (A y B) Modelo de "hoja de trébol" (A) y modelo tridimensional (B) del esqueleto general de un tRNA. Los tallos-lazos de las diferentes partes funcionales del tRNA se muestran en un color diferente. (C) Figura adaptada de [Reiter et al., 2010] que muestra la estructura cristalina de la holoenzima RNasa P de *T. maritima* en complejo con el tRNA^{Phe}. Se muestran dos vistas de este complejo.

En la actualidad, se piensa que la habilidad de la RNasa P para identificar diferentes sustratos se debe al reconocimiento de la estructura a través de contactos múltiples más que a un reconocimiento de secuencias específicas en el sustrato (con la excepción de la secuencia CCA 3' terminal en bacterias). Otros sustratos para la RNasa P deben contener características similares que mimetizan la estructura de reconocimiento en los tRNAs.

I.4.1.- RNasa P de *Synechocystis sp.*

En bacterias, la RNasa P está compuesta por una subunidad de RNA y una subunidad proteica. La subunidad de RNA es el componente catalítico y, bajo condiciones apropiadas *in vitro*, puede cortar sustratos en ausencia de proteína [Guerrier-Takada *et al.*, 1983]. En este trabajo se ha utilizado la subunidad de RNA de la RNasa P de la cianobacteria *Synechocystis sp.* PCC 6803 que fue caracterizada en el año 1992 por Vioque [Vioque, 1992]. La RNasa P es esencial en la cianobacteria *Synechocystis*. Además de su implicación en el procesamiento de los pre-tRNAs, otros sustratos como el RNA 4'5S y tmRNA también dependen de la RNasa P para su procesamiento *in vivo* [Tous *et al.*, 2001].



Al contrario de lo que ocurre en otras RNasas P bacterianas, el ribozima de *Synechocystis sp.* no requiere la secuencia CCA en el extremo 3' terminal del sustrato pre-tRNA para una actividad eficiente [Pascual and Vioque, 1999].

Las condiciones de corte para este ribozima *in vitro* implican una clara dependencia tanto de iones divalentes como de iones monovalentes [Pascual and Vioque, 1999].

Fig. I.14.- Estructura secundaria propuesta para el RNA de la RNasa P de la cianobacteria *Synechocystis sp.* PCC 6803. Figura tomada de la base de datos para la RNasa P [Brown, 1999] en la dirección <http://www.mbio.ncsu.edu/RNaseP/home.html>

I.4.2.- RNasa P HUMANA

La RNasa P nuclear purificada de células HeLa tiene al menos 10 subunidades proteicas asociadas con una única subunidad de RNA (RNA H1) [Eder *et al.*, 1997; Jarrous and Altman, 2001]. Las subunidades proteicas se denominan Rpp14, Rpp20, Rpp21, Rpp25, Rpp29, Rpp30, Rpp38, Rpp40, hPop1 y hPop5. Estudios de biología

celular han detectado el RNA H1 y las subunidades proteicas de la RNasa P humana en diferentes compartimentos intracelulares que incluyen el nucleoplasma, nucleolo, cuerpos de Cajal, compartimento perinucleolar y citoplasma (revisado en [Jarrous, 2002; Jarrous and Reiner, 2007]).

La RNasa P humana aparece como parte de un complejo con la RNasa MRP, una ribonucleasa localizada fundamentalmente en el nucleolo e implicada en el procesamiento de los pre-rRNAs, con la que comparte la mayoría de los componentes proteicos [Esakova and Krasilnikov, 2010]. La RNasa P altamente purificada no puede llevar a cabo el corte de los pre-rRNAs [Vioque and Altman, 2001].

Además del papel que tiene en la maduración del extremo 5' de los pre-tRNAs, la RNasa P nuclear humana está también involucrada en el proceso de transcripción del tRNA y otros RNAs no codificantes en células HeLa y extractos celulares [Reiner et al., 2006]. Este papel lo ejerce a través de su interacción con la RNA polimerasa III y la cromatina de los genes del tRNA y del rRNA 5S. También se ha demostrado el corte en la región 3' de un RNA no codificante, el transcrito MALAT1 relacionado con cáncer, donde la RNasa P reconoce una estructura tipo tRNA [Wilusz et al., 2008]. Y, recientemente, se ha demostrado el corte endoribonucleolítico del mRNA de la proteína viperina por la RNasa MRP y/o RNasa P en células humanas [Mattijssen et al., 2010]. Esta es la primera evidencia del corte de estas ribonucleasas en la secuencia codificante de un mRNA.

0.- OBJETIVOS

Trabajos previos en los que se han utilizado enzimas de la familia RNasa III y RNasa P han permitido encontrar varios motivos estructurales tipo tRNA y dsRNA en la región 5' de varios genomas virales pertenecientes a los géneros *Hepacivirus* y *Pestivirus* de la familia *Flaviviridae*. Este trabajo ha centrado su estudio en la búsqueda de motivos estructurales reconocidos por las ribonucleasas anteriores en el *West Nile virus*, que pertenece al género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae*.

En concreto, los objetivos de este trabajo han sido:

- 1.- Determinar si las ribonucleasas específicas de doble cadena, RNasa III de *Escherichia coli* y RNasa III eucariota Dicer, reconocen motivos estructurales en los primeros 702 nucleótidos del genoma del WNV *in vitro*.
- 2.- Determinar si las ribonucleasas específicas del procesamiento del tRNA, subunidad RNA de la RNasa P de *Synechocystis* sp. y RNasa P humana, reconocen motivos estructurales en los primeros 702 nucleótidos del genoma del WNV *in vitro*.
- 3.- Realizar un estudio detallado de la estructura que reconocen las RNasas III y P en el genoma del WNV mediante métodos enzimáticos clásicos y ensayos de hibridación a microarrays de oligonucleótidos complementarios de DNA.

M.- MATERIALES Y MÉTODOS

M.1.- MATERIALES

M.1.1.- MEDIOS DE CULTIVO

M.1.1.1.- Medio líquido LB

NaCl	10 g/l
Triptona	10 g/l
Extracto de levadura	5 g/l

M.1.1.2.- Medio sólido LA (LB-agar)

15 g de agar bacteriológico por litro de LB

M.1.1.3.- Medio líquido para levaduras

Extracto de levadura	10 g/l
Bactopeptona	20 g/l
Glucosa	20 g/l

M.1.2.- TAMPONES

M.1.2.1.- Tampón TSE 10X

NaCl	1 M
EDTA	10 mM
Tris-HCl pH 7'5	0'5 M

M.1.2.2.- Tampón elución T1 10X

EDTA pH 7'5	10 mM
Tris-HCl pH 7'5	100 mM

M.1.2.3.- Tampón P 5X

HEPES-KOH pH 7'5	50 mM
Ac ₂ Mg	50 mM
AcNH ₄	500 mM

M.1.2.4.- Tampón Dicer 5X

NaCl	1500 mM
HEPES	100 mM
MgCl ₂	25 mM
Tris-HCl pH 8	250 mM

M.1.2.5.- Tampón cyano 5X

Tris-HCl pH 7'5	250 mM
MgCl ₂	500 mM
KCl	5 M

M.1.2.6.- Solución para hidrólisis alcalina de RNA 10X

Carbonato sódico	0'1 M
Bicarbonato sódico	0'1 M
pH	9'5

M.1.2.7.- Tampón para la degradación con RNasa T1 en condiciones desnaturizantes 2X

Citrato sódico pH 4'5	20 mM
EDTA	1 mM
Urea	7 M
Azul de bromofenol	0'1% (p/v)
Xilencianol	0'1% (p/v)

M.1.2.8.- Tampón desnaturizante para carga en geles de poliacrilamida 1'5X

Formamida desionizada	97'5% (v/v)
EDTA pH 7'5	10 mM
Azul de bromofenol	0'025% (p/v)
Xilencianol	0'025% (p/v)

M.1.2.9.- Tampón no desnaturizante para carga en geles de agarosa 6X

Sacarosa	20% (p/v)
EDTA	10 mM
Tris-HCl pH 8	50 mM
Azul de bromofenol	0'25% (p/v)
Xilencianol	0'25% (p/v)

M.1.2.10.- Tampón de electroforesis TBE 1X

Tris-Borato	89 mM
EDTA	2 mM
pH 8	

M.1.2.11.- Tampón de electroforesis TAE 1X

Tris-Acetato	40 mM
EDTA	1 mM
pH 8	

M.1.3.- CEPAS BACTERIANAS

La cepa bacteriana empleada a lo largo de este trabajo ha sido DH5 α que pertenece a la especie *E. coli*.

M.1.4.- MOLDES EMPLEADOS PARA LAS REACCIONES DE TRANSCRIPCIÓN

M.1.4.1.- Vectores construidos en este trabajo

M.1.4.1.1.- pUC19+LC1-704

Construcción plasmídica que contiene los primeros 702 nucleótidos del genoma del WNV clonados tras el promotor de la T7 RNA polimerasa en el pUC19 (NEB). Tras digerir con la enzima de restricción *Bam*HI esta construcción actúa como molde para la síntesis del RNA WNV 1-702 (un RNA de 704 nucleótidos de longitud). Para construir este vector se utilizó el DNA plasmídico del clon LC1 cedido por el Dr. Juan Carlos Saiz que contiene los primeros 1848 nucleótidos del genoma del WNV (amplificados a partir del aislado WNV “cepa NY99-flamingo382-99” con número de

acceso al GenBank AF196835 [*Lanciotti et al.*, 1999]) clonados en el vector pcDNA3.1/V5-His-TOPO. Para realizar la construcción del pUC19+LC1-704, primero se aisló el fragmento de LC1 que se localiza entre *Bam*HI y *Not*I, y se amplificó el fragmento correspondiente a los primeros 702 nucleótidos del WNV utilizando los oligos EcoRI-T7p-5'LC1 (5'-CATGAATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGTAGTTCGCCTGTGTGAG-3') y BamHI-LC1(702) (5'-AGTGGATCCATACCTGACGTAGACTGCTG-3'), donde la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción que lleva el nombre del oligo se indica en cursiva y la secuencia correspondiente al promotor de la T7 RNA polimerasa se ha subrayado. Este fragmento amplificado se subclonó en el pUC19 (NEB) previa digestión de ambos con *Eco*RI y *Bam*HI.

M.1.4.1.2.- pUC19+251

Construcción plasmídica que contiene los nucleótidos 440 al 690 del genoma del WNV clonados tras el promotor de la T7 RNA polimerasa en el pUC19. Tras digerir con la enzima de restricción *B*lpI, esta construcción actúa como molde para la síntesis del RNA WNV 440-690 (un RNA de 251 nucleótidos de longitud). Para realizar la construcción del pUC19+251, primero se aisló el fragmento de LC1 que se localiza entre *Bam*HI y *Not*I, y se amplificó el fragmento que comprende los nucleótidos 440 al 690 del WNV utilizando los oligos 5'(251) (5'-CATGAATTCTAATACGACTCACTATAGGGTTGGCCTGATCGCCAGCGT-3') y 3'(251) (5'-AGT**GGATCC**AGT**GCTCAGCG**TAGACTGCTGACTTTGTG-3'), donde la secuencia de reconocimiento de *Eco*RI se muestra en cursiva, la de *Bam*HI en negrita y la de *B*lpI en negrita y cursiva; y la secuencia correspondiente al promotor de la T7 RNA polimerasa se ha subrayado. Este fragmento amplificado se subclonó en el pUC19 (NEB) previa digestión de ambos con *Eco*RI y *Bam*HI.

M.1.4.1.3.- pUC19+222

Construcción plasmídica que contiene los nucleótidos 450 al 671 del genoma del WNV clonados tras el promotor de la T7 RNA polimerasa en el pUC19. Esta construcción actúa como molde para la síntesis del RNA WNV 450-671, un RNA de 222 nucleótidos de longitud, tras su digestión con la enzima de restricción *B*lpI. Para realizar la construcción del pUC19+222, primero se aisló el fragmento de LC1 que se

localiza entre *Bam*HI y *Not*I, y se amplificó el fragmento que comprende los nucleótidos 450 al 671 del WNV utilizando los oligos 5'(222) (5'-CATGAATTCTAATACGACTCACTATAGGGCGCCAGCGTAGGAGCAGTT-3') y 3'(222) (5'-AGT**GGATCC**AGT**GTCAGCC**ACCAACAGTCGATGTCTT-3'), donde la secuencia correspondiente a *Eco*RI se muestra en cursiva, la de *Bam*HI en negrita, y la de *B*lpI en negrita y cursiva; y la secuencia del promotor de la T7 RNA polimerasa se ha subrayado. Este fragmento amplificado se subclonó en el pUC19 (NEB) previa digestión de ambos con *Eco*RI y *Bam*HI.

M.1.4.2.- Otros vectores utilizados en este trabajo

M.1.4.2.1.- pT76803

El plásmido pT76803 [*Pascual and Vioque, 1996*], cedido por el Dr. Vioque, contiene el gen que codifica para el RNA de la RNasa P de la cianobacteria *Synechocystis sp.* PPC 6803 (Rz6803) clonado tras el promotor de la T7 RNA polimerasa. Tras digerir con la enzima de restricción *Dra*I esta construcción actúa como molde para la síntesis del RNA Rz6803 (un RNA de 437 nucleótidos de longitud).

M.1.4.2.2.- pUC19TyrT

El plásmido pUC19TyrT [*Guerrier-Takada et al., 1989*], cedido por el Dr. Robertson, contiene el precursor del tRNA de la tirosina clonado tras el promotor de la T7 RNA polimerasa en el pUC19. Tras digerir con la enzima de restricción *Fok*I esta construcción actúa como molde para la síntesis del RNA pre-Tyr (un RNA de 139 nucleótidos de longitud).

M.1.4.3.- Moldes de DNA parcialmente de doble cadena

- Para sintetizar el RNA R1.1 se utilizaron los oligos asT7R1.1 (5'-AAGAAGGTCAATCATAAAGGCCACTCTTGCGAATGACCTTGAGTTTGTCCCTCTACCCTATAGTGAGTCGTATTA-3') y T7PromoterPrimer (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3').
- Para sintetizar el RNA pre-miR-122 se utilizaron los oligos asT7pre-miR122 (5'-AGCTATTTAGTGTGATAATGGCGTTTGATGGTTTGGACACAAACACCATTGTCACACTCCACAGCCTATAGTGAGTCGTATTA-3') y T7PromoterPrimer2G (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3').

M.1.5.- OLIGONUCLEÓTIDOS SINTÉTICOS UTILIZADOS EN LOS MICROARRAYS DE DNA

Nombre	Secuencia (5' → 3')
WNV-1	GCTCACACAGGCGAACTACT
WNV-21	AAACACTACTAAGTTTGTC
WNV-41	TAATTGTTGTTAATCCTCAC
WNV-61	AGAAACAGCTCGCACTGTGT
WNV-81	ACATCGAGATCTTCGTGCTA
WNV-101	GGGCCCTCCTGGTTTCTTAG
WNV-121	TTGACAGCCCGGCTCTTGCC
WNV-141	GCATTCCGCGTTTTAGCATA
WNV-161	AATCAAGGACAACACGCGGG
WNV-181	AACATAGCCCTCTTCAGTCC
WNV-201	CCTTGCCGTCGATCAGGCTC
WNV-221	CAACACAAATCGTATTGGCC
WNV-241	CTGAAGAACGCCAAGAGAGC
WNV-261	TCGGAGCAATTGCTGTGAAC
WNV-281	TCGATCCAGCACTGCTCGGG
WNV-301	TGTTTGTTACACCTCTCCA
WNV-321	GAAGGTGTTTCATCGCTGTT
WNV-341	TAGTTCCTTCTTAAACTCA
WNV-361	ATAGCACTGGTCAAGGTCCC
WNV-381	GTTTTGAGCTCCGCCGATTG
WNV-401	CTTCCTCCTCTTTTCTTTT
WNV-421	ATCATGACTGCAATTCCGGT
WNV-441	CTACGCTGGCGATCAGGCCA

WNV-461 GTTAGAGAGGGTAACTGCTC
WNV-481 ATCATCACCTTCCCTTGGAA
WNV-501 CGTCAGTAGCATTTACCGTC
WNV-521 AATCGTGATGACATCTGTGA
WNV-541 TTCTTTCCAGCAGCTGTTGG
WNV-561 TTGCTCTGACAATGCATAGG
WNV-581 GCACATGTATCCCACATCCA
WNV-601 TCATAAGTGATAGTATCATC
WNV-621 CAGCCGACAGCACTGGGCAT
WNV-641 GATGTCTTCTGGATCATTAC
WNV-661 GACTTTGTGCACCAACAGTC
WNV-681 CATACTGACGTAGACTGCT

M.1.6.- ISÓTOPOS RADIATIVOS

Los isótopos radiactivos utilizados para el marcaje de los RNAs de esta Tesis Doctoral fueron $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP}$ y $[5'\text{-}^{32}\text{P}]\text{-pCp}$ con una actividad específica de 3000 Ci/mmol y una concentración de 10 mCi/ml, y $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP}$ con una actividad específica de 6000 Ci/mmol y una concentración de 10 mCi/ml. Todos estos isótopos fueron suministrados por la casa comercial Perkin Elmer.

M.1.7.- PATRONES DE PESO MOLECULAR PARA ELECTROFORESIS

- **RNA Century™ Marker-Plus (Ambion).** Patrón de peso molecular para RNA que fue preparado siguiendo el protocolo que suministra la casa comercial para dar lugar a 7 transcritos marcados radiactivamente de 100, 200, 300, 400, 500, 750 y 1000 nucleótidos.
- **Decade™ Marker System (Ambion).** Patrón de peso molecular para RNA que fue preparado siguiendo el protocolo que suministra la casa comercial para dar lugar a fragmentos de RNA marcados radiactivamente de 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 y 10 nucleótidos de longitud.

- **2-Log DNA Ladder (NEB)**. Patrón de peso molecular para electroforesis en gel de agarosa que incluye fragmentos de DNA que van desde las 100 pares de bases hasta las 10 kb.

M.1.8.- ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS

- La predicción de la estructura secundaria del RNA se realizó con la versión 3 del programa informático *mfold* [Mathews et al., 1999] que se puede localizar en el servidor *mfold* [Zuker, 2003] en la dirección <http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form>.
- La predicción de *pseudoknots* en el RNA se ha realizado utilizando el algoritmo ProbKnot [Bellaousov and Mathews, 2010].
- La alineación de secuencias se realizó utilizando los programas informáticos ClustalW2 en la dirección <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>, y DIALIGN-TX en la dirección <http://dialign-tx.gobics.de/submission?type=dna>.

M.2.- MÉTODOS

M.2.1.- CULTIVO DE BACTERIAS

Las cepas de *E. coli* utilizadas en este trabajo se cultivaron en medio líquido o en medio sólido. Los cultivos en medio líquido se realizaron con LB (apartado M.1.1.1) suplementado con ampicilina a una concentración final de 50 µg/ml y se dejaron incubar a 37°C y en agitación a 200 rpm. Los cultivos en medio sólido se realizaron en LB-agar (apartado M.1.1.2) y ampicilina 50 µg/ml en placa de Petri. Una vez sembradas las bacterias se incubaron a 37°C.

M.2.2.- CRIOCONSERVACIÓN DE BACTERIAS

Las bacterias se crecieron en medio líquido toda la noche (apartado M.2.1) y el cultivo se congeló en crioviales de 2 ml con glicerol al 30%. Se guardó a -80°C hasta su utilización.

M.2.3.- TRANSFORMACIÓN DE *E. coli* CON PLÁSMIDOS RECOMBINANTES

La incorporación de un plásmido recombinante en la cepa bacteriana *E. coli* (transformación bacteriana) se llevó a cabo mediante la aplicación de un pulso de corriente eléctrica (electroporación) para aumentar la permeabilidad de la membrana plasmática de las bacterias.

M.2.3.1.- Preparación de células electrocompetentes

En algunos casos se utilizaron las células electrocompetentes ElectroMAX™ DH5α-E™ Cells (Invitrogen).

En otros casos, las células electrocompetentes se prepararon como se detalla a continuación: se preinoculó una colonia de DH5 α (ElectroMAX™ DH5 α -E™ Cells (Invitrogen)) en 25 ml de medio líquido LB y se creció toda la noche en agitación (160 rpm) a 37°C. 15 ml de este preinóculo se inoculó en 1 litro de medio LB que se dejó unas 3 horas en agitación a 37°C hasta alcanzar una OD₆₀₀ de aproximadamente 0'6. Las células se mantuvieron en hielo unos 20 minutos y pasado este tiempo se repartieron en botellas de polipropileno para centrifuga (Beckman Coulter) previamente enfriadas en hielo. Las células se centrifugaron a 4°C en un rotor JA-14 a 4000 g durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y las células se lavaron con 250 ml de agua enfriada a 4°C. El proceso de centrifugación y lavado se volvió a repetir. Y, tras una nueva centrifugación, esta vez las células se lavaron con 250 ml de agua con glicerol al 10% enfriado a 4°C. Se volvieron a centrifugar, se descartó el sobrenadante y tras resuspender el precipitado en 1 ml de agua con glicerol al 10% se hicieron alícuotas de 40 μ l que fueron guardadas a -80°C hasta su uso.

M.2.3.2.- Electroporación

Con el fin de eliminar las sales antes de aplicar el pulso de corriente eléctrica, la solución con el plásmido recombinante fue dializada durante 30 minutos con unos discos de membrana de 0'025 μ m MF-Millipore Membrana Filter (Millipore) para microvolúmenes.

Cada transformación fue realizada de la siguiente manera: una alícuota de 40 μ l de células DH5 α electrocompetentes (apartado M.2.3.1) fue descongelada y mezclada rápidamente con 3 μ l de la solución del plásmido recombinante previamente dializada. La mezcla se colocó en una cubeta de electroporación Gene Pulser® Cuvette, 0'2 cm (Bio-Rad) previamente enfriada en hielo, e inmediatamente se le aplicó un pulso eléctrico sencillo de una duración de 5-6 mseg a 2'5 kV y 129 ohmios en el BTX Electro Cell Manipulator® 600. Las células fueron recuperadas inmediatamente lavando la cubeta con 1ml de medio LB previamente atemperado a 37°C, y se incubaron a 37°C en agitación (225 rpm) durante una hora. Unos 10-50 μ l de suspensión celular se extendieron en placa de Petri con agar (apartado M.1.1.2) y medio selectivo (ampicilina 50 μ g/ml, X-gal 40 μ g/ml e IPTG (Promega) 150 μ g/ml) utilizando un asa de Digralsky previamente esterilizada con etanol y a la llama. Se incubaron a 37°C durante unas 16 horas hasta que aparecieron colonias.

M.2.3.3.- Selección de colonias recombinantes de *E.coli*

Las bacterias transformadas fueron seleccionadas por la resistencia al antibiótico conferida por el plásmido.

Las colonias recombinantes se identificaron por expresión del gen de la β -galactosidasa. Tanto la cepa bacteriana DH5 α como los plásmidos que se utilizaron en esta Tesis Doctoral son defectivos para el gen *lacZ* que codifica para la β -galactosidasa. Cuando se asocian los dos fragmentos inactivos de la β -galactosidasa (el de la bacteria y el del plásmido) forman una enzima funcional, fenómeno conocido como complementación α . El X-gal es convertido por la β -galactosidasa en un compuesto insoluble azul. Así, en presencia del sustrato cromogénico X-gal y del inductor IPTG, las células transformadas adquieren coloración azul. El sitio de clonación en este tipo de plásmidos se sitúa dentro del marco abierto de lectura del gen *lacZ*, por lo que en los plásmidos recombinantes que contienen un inserto se altera la pauta de lectura del gen y las colonias aparecen blancas.

M.2.4.- EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO

Los plásmidos utilizados en esta Tesis Doctoral fueron extraídos de la cepa correspondiente mediante minipreparación utilizando el kit Wizard[®] Plus SV Minipreps Purification Systems (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante.

M.2.5.- EXTRACCIÓN DEL RNA GENÓMICO L-A

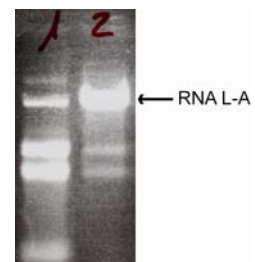
La cepa SK'1 Δ cedida por la Dra. Rosa Esteban fue crecida en medio líquido para levaduras (apartado M.1.1.3) en agitación a 29°C durante 2 días. Transcurrido ese tiempo el cultivo se centrifugó durante 3 minutos a 14500 rpm. Las células se lavaron con 1000 μ l de agua y se volvió a centrifugar 3 minutos a 14500 rpm. El precipitado se resuspendió en una solución Tris-HCl 50 mM pH 8 y NaCl 100 mM. Se añadieron unas bolitas de vidrio lavadas en ácido de 425-600 μ m (Sigma) hasta el menisco y, un proceso de agitación vigorosa durante 15 segundos e incubación en

hielo durante 1 minuto, se repitió un total de 10 veces. Se añadió 500 µl de la solución Tris-HCl 50 mM pH 8 y NaCl 100 mM y se recogió el lisado. Se hizo una extracción con fenol saturado en agua primero y una extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) después. La fase acuosa se precipitó y el RNA total se resuspendió en 70 µl de agua. Se cargó una alícuota en un gel de agarosa al 1'3% y se tiñó con bromuro de etidio para visualizar el RNA total.

La separación del dsRNA L-A del RNA total se realizó utilizando columnas de CF11. La CF11 es un tipo de celulosa de fibra corta que tiene habilidad para separar RNA de simple y doble cadena. Una suspensión de CF11 se preparó añadiendo 130 g de CF11 (Whatman®) a 1 litro de NaOH 0'1 M, se agitó durante 30 minutos y se dejó reposar durante otros 30 minutos. Tras retirar el sobrenadante, a la CF11 se le realizaron 10 lavados con agua. Cada lavado consistió en añadir 1 litro de agua, agitar durante 30 minutos y dejar reposar hasta que el sobrenadante quedaba transparente. Por último, la CF11 se conservó en 1 litro de EDTA 2 mM pH 8 y a 4°C.

Se preparó una columna en la que la suspensión de CF11 se añadió para tener un lecho de fase estacionaria de aproximadamente 1ml empaquetado por decantación durante 15 minutos. La columna fue equilibrada con 5 volúmenes de TSE 1X:EtOH 15% previamente desgasificado y se añadió un volumen final de 1000 µl del RNA total en TSE 1X y 15% de EtOH. La columna se lavó con 10 volúmenes de TSE 1X:EtOH 15% y el dsRNA se eluyó con 4ml de TSE 1X. Se recogieron varias fracciones que fueron analizadas para estimar la pureza y calidad del RNA midiendo la absorbancia a 260 y visualizándolas en un gel de agarosa al 1'3% teñido con bromuro de etidio. Las fracciones que contenían el RNA L-A, se precipitaron y se resuspendieron en agua.

La imagen que se muestra a continuación contiene una muestra de RNA total antes de pasar por CF11 (carril 1) y otra muestra de RNA total después de pasar por CF11 (carril 2) en la que se observa una acumulación diferencial del RNA L-A tras pasar por CF11.



M.2.6.- SECUENCIACIÓN DE DNA

La secuenciación de las muestras de DNA fue realizada por el servicio de secuenciación del Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra" de Granada.

La secuenciación de DNA se realizó mediante el procedimiento de secuenciación cíclica utilizando la química BigDyeTerminator v3.1 y electroforesis en sistema multicapilar automático. El equipo utilizado fue el secuenciador 3130XL Genetic Analyzer de Applied Biosystems de 16 capilares.

M.2.7.- SÍNTESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

M.2.7.1.- Síntesis química de oligonucleótidos

Los oligodesoxirribonucleótidos sintéticos utilizados en este trabajo fueron sintetizados, por lo general, en el servicio de síntesis de oligonucleótidos del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra” de Granada. La síntesis se llevó a cabo en el sintetizador 3400 DNA Synthesizer (Applied Biosystems) y posteriormente fueron purificados por HPLC.

Los oligodesoxirribonucleótidos sintéticos empleados en los microarrays de DNA fueron comprados a Sigma-Aldrich.

M.2.7.2.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones de amplificación de DNA mediante PCR se llevaron a cabo en un volumen de reacción de 50 µl. En la mezcla de reacción se incluyó 20 ng de DNA molde, tampón de reacción PCR Buffer II 1X (Applied Biosystems), 1'5 mM de MgCl₂ (Roche), dNTPs (NEB) 0'2 mM cada uno, 20 pmoles de cada uno de los cebadores y 1'25 U de la polimerasa AmpliTaq[®] Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems). Se utilizó un termociclador iCycler (Bio-Rad).

Los protocolos de amplificación utilizados a lo largo de este trabajo fueron variados. Por lo general, se utilizaron 30 ciclos de amplificación compuestos por 1 minuto de desnaturalización a 94°C, 1 minuto de hibridación a la temperatura calculada para los cebadores y 2 minutos de extensión a 72°C. Estos 30 ciclos fueron precedidos por un paso de desnaturalización inicial de 10 minutos a 94°C, y seguidos de una elongación final de 10 minutos a 72°C. En el caso de las amplificaciones que

incorporaban el promotor de la T7 RNA polimerasa en los cebadores, antes de los 30 ciclos, se incluyeron 4 ciclos en los que la temperatura de hibridación fue más baja que la calculada para los cebadores.

Tras la reacción de amplificación de DNA, los productos de PCR fueron purificados utilizando el kit de purificación de productos de PCR de Roche siguiendo el protocolo que suministra el fabricante.

M.2.7.3.- Síntesis de RNA

M.2.7.3.1.- Transcripción *in vitro*

Todos los RNAs utilizados en este trabajo fueron sintetizados mediante transcripción *in vitro* utilizando la T7 RNA polimerasa de Promega. La reacción estándar se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl incluyendo el tampón suministrado por la casa comercial a 1X, 4 mM de DTT (Promega), 0'8 U/µl de RNasin® Plus RNase Inhibitor (Promega), rNTPs (Promega) 0'4 mM cada uno, 1 µg de DNA molde y 1'44 U/µl de la T7 RNA polimerasa (Promega). La reacción fue incubada 1 hora a 37°C y, finalmente, el DNA molde fue eliminado mediante digestión con RQ1 DNasa (Promega) (apartado M.2.14.1.2).

En el caso de las transcripciones del RNA R1.1 y RNA pre-miR-122, en las que el DNA molde es parcialmente de doble cadena, el protocolo varió un poco. Se partió de 2 µg del molde (asT7R1.1 y asT7pre-miR122) y se utilizaron los oligodesoxirribonucleótidos correspondientes (apartado M.1.4.3) en cantidades equimolares. Se calentó la mezcla de oligos, por un lado, y el tampón de transcripción, por el otro, 2 min a 95°C. Se mezclaron y se dejó a temperatura ambiente 15 minutos. Después se añadió el DTT, RNasin, rNTPs y T7 RNA polimerasa tal y como se indicó anteriormente para la reacción de transcripción estándar.

Para algunos casos concretos en los que la cantidad necesaria de RNA fue elevada se utilizó el kit MEGAscript® T7 (Ambion) siguiendo las instrucciones del fabricante.

M.2.7.3.2.- Purificación de la transcripción

A la reacción de transcripción se le añadió 975 µl de TSE 1X (apartado M.1.2.1) y 500 µl de fenol saturado en agua. Se agitó 1 minuto y se centrifugó 4 minutos a 11000 rpm. Se recogió la fase acuosa, se le añadió 1 volumen de etanol frío y se fraccionó con una columna de CF11 para separar el RNA de simple cadena y eliminar sales y nucleótidos no incorporados de la mezcla de reacción.

Se preparó una suspensión de CF11 (Whatman®) como se describe en el apartado M.2.5. Para hacer las columnas de CF11 se utilizaron jeringas de vidrio (NORMAX) de 1 ml fijadas en un soporte. Se añadió la suspensión de CF11 (Whatman®) para tener un lecho de fase estacionaria de aproximadamente 250 µl empaquetado por decantación durante 15 minutos. La columna fue equilibrada con 1 ml de TSE 1X, 1 ml de agua y 3 ml de TSE 1X:EtOH previamente desgasificados. Tras pasar la mezcla de transcripción, la columna se lavó con 3 ml de TSE1X:EtOH y finalmente el transcrito se eluyó con 2 ml de agua y se precipitó.

La precipitación se realizó en un tubo COREX donde a la muestra a precipitar se le añadió el 10% de su volumen de una mezcla de AcNa 3 M pH 5'3 y glicógeno 0'2 µg/µl, y 2'5 volúmenes de etanol frío. Se mezcló, se incubó 1 hora a -20°C y se centrifugó a 4°C 90 minutos a 10000 rcf.

Por último, el transcrito se purificó a partir de un gel de poliacrilamida como se detalla en apartado M.2.10.2.

M.2.8.- TÉCNICAS DE MARCAJE RADIOACTIVO DEL RNA

M.2.8.1.- Marcaje interno

El marcaje interno de un RNA con el isótopo radiactivo ³²P se realizó añadiendo 40 µCi de [α-³²P]-GTP 3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml (Perkin Elmer) a la mezcla de reacción de transcripción estándar del apartado M.2.7.3.1.

M.2.8.2.- Marcaje en el extremo 5'

El marcaje de un RNA en su extremo 5' con el isótopo radiactivo ^{32}P se realizó añadiendo 140 μCi de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP}$ 6000 Ci/mmol, 10 mCi/ml (Perkin Elmer) a la mezcla de reacción de transcripción estándar del apartado M.2.7.3.1 en la que, además, se disminuyó la concentración de rGTP no radiactivo a 0'1 mM.

M.2.8.3.- Marcaje en el extremo 3'

La reacción de marcaje de un RNA en su extremo 3' se realizó con $[\text{5}'\text{-}^{32}\text{P}]\text{-pCp}$ utilizando la enzima T4 RNA ligasa (Promega) en un volumen final de reacción de 20 μl . En la mezcla de reacción se incluyó 1 μg del transcrito a marcar junto con el tampón de reacción suministrado por la casa comercial a 1X, 0'01% de BSA, 1% de PEG, 1 U/ μl de RNasin (Promega), 20 μCi de $[\text{5}'\text{-}^{32}\text{P}]\text{-pCp}$ 3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml (Perkin Elmer) y la enzima T4 RNA ligasa a 0'5 U/ μl . La reacción fue incubada a 4°C durante aproximadamente 60 horas. Tras este tiempo, el marcaje fue tratado con proteinasa K (apartado M.2.13.1), precipitado y purificado utilizando una columna de CF11 (apartado M.2.7.3.2).

M.2.9.- ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

M.2.9.1.- En geles de agarosa

Los geles de agarosa se prepararon, dependiendo del tamaño del fragmento en estudio, en un rango de 0'8-2% (p/v) de agarosa en TAE 1X (apartado M.1.2.11). Las muestras se prepararon en tampón de carga no desnaturizante 1X (apartado M.1.2.9) y la electroforesis se desarrolló en tampón TAE 1X a 100 V. Tras la electroforesis, el gel fue teñido con una solución de bromuro de etidio en agua a una concentración de 0'5 $\mu\text{g/ml}$ y fue visualizado por transiluminación con luz ultravioleta a 312nm.

M.2.9.2.- En geles desnaturalizantes de poliacrilamida

Los geles de poliacrilamida se prepararon, según el tamaño del fragmento en estudio, al 4-10% (p/v) de acrilamida:bis-acrilamida (19:1) en TBE 1X (apartado M.1.2.10) y 7 M de urea. Como catalizadores de la reacción de polimerización de la acrilamida se utilizaron persulfato de amonio al 0'08% (p/v) y TEMED al 0'08% (v/v). Las muestras se prepararon en tampón de carga desnaturalizante 1X (apartado M.1.2.8) y se desnaturalizaron a 90°C durante 1 minuto antes de ser cargadas en el gel. La electroforesis se desarrolló en tampón TBE 1X a 25 mA y durante un tiempo variable dependiendo del tamaño del fragmento en estudio y de la capacidad resolutive del gel.

En la mayoría de los casos, los geles se expusieron con una película de doble emulsión Super RX (FUJIFILM) en un cassette BioMax de KODAK con una pantalla intensificadora BioMax MS y se mantuvieron a -80°C el tiempo necesario para su posterior visualización. Para visualizar el resultado se utilizó la máquina reveladora Curix 60 (Agfa). En los casos en que fue necesaria una cuantificación posterior del resultado, el gel fue secado a 80°C en condiciones de vacío, se expuso en un cassette *Storage Phosphor Screen* (GE Healthcare) y se visualizó en el escáner Typhoon 9400 (Amersham Biosciences).

M.2.10.- PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS DE GEL

M.2.10.1.- Purificación de DNA a partir de geles de agarosa

El fragmento de interés fue separado del resto en base a su tamaño por electroforesis en gel de agarosa (apartado M.2.9.1). El gel fue teñido con una solución de bromuro de etidio y, una vez localizado el fragmento de interés por transiluminación con luz ultravioleta a 312 nm, la sección de gel correspondiente fue recortado con ayuda de una cuchilla. El DNA fue recuperado utilizando el kit de purificación de productos de PCR de Roche siguiendo el protocolo que suministra la casa comercial para purificación del DNA a partir de geles de agarosa.

M.2.10.2.- Purificación de RNA a partir de geles de poliacrilamida

El fragmento de interés fue separado del resto en base a su tamaño por electroforesis en gel de poliacrilamida (apartado M.2.9.2). La mayoría de fragmentos de RNA purificados en este trabajo estaban marcados radiactivamente y, para los que no lo estaban, se utilizó como marcador el mismo fragmento marcado radiactivamente. El gel se expuso con una película de doble emulsión Super RX (FUJIFILM) el tiempo necesario para su posterior visualización y la película fue revelada utilizando la máquina reveladora Curix 60 (Agfa). La sección del gel con el fragmento de RNA de interés fue recortado con ayuda de una cuchilla, se le añadió 2 ml de tampón de elución T1 1X (apartado M.1.2.2) y se incubó en agitación toda la noche a 37°C. El RNA fue recuperado a partir del tampón de elución mediante precipitación con etanol (según el protocolo de precipitación del apartado M.2.7.3.2).

M.2.11.- CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

M.2.11.1.- Cuantificación mediante espectrofotometría

La concentración de los ácidos nucleicos en solución fue determinada utilizando el NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (Nucliber).

M.2.11.2.- Cuantificación de un RNA marcado con radiactividad en solución

El cálculo de la cantidad obtenida por transcripción de un RNA marcado internamente con [α - 32 P]-GTP en solución se hizo a partir de la medida de las cpm (cuentas por minuto) de la muestra en el "Bioscan QC-2000". Para calcular los μ g del transcrito se aplicó la siguiente fórmula:

$$\frac{\mu\text{g rNTPs}}{\frac{\text{cpm}}{\mu\text{l}} \times \mu\text{l } \alpha^{32}\text{P-GTP}} = \frac{\mu\text{g transcrito}}{\text{cpm transcrito}}$$

μ g rNTPs: μ g de ribonucleótidos no radiactivos incorporados en la reacción de transcripción

cpm/ μ l: valor en cpm/ μ l de la dilución 1:100 del [α - 32 P]-GTP incorporado en la transcripción

μ l: μ l de [α - 32 P]-GTP incorporados a la reacción de transcripción

μ g transcrito: μ g del transcrito que se quiere calcular

cpm transcrito: valor en cpm obtenidas para el transcrito

Donde la primera parte de la ecuación pertenece a las cantidades incorporadas a la reacción de transcripción y la segunda parte corresponde a los datos del transcrito.

M.2.11.3.- Cuantificación de un RNA marcado con radiactividad inmovilizado en geles de poliacrilamida

El gel de poliacrilamida se expuso con una pantalla *Storage Phosphor Screen* (GE Healthcare) que fue posteriormente escaneada en el equipo Typhoon 9400 (Amersham Biosciences). La cuantificación se realizó utilizando el programa ImageQuant 5.2.

M.2.12.- ENSAYOS DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

M.2.12.1.- Reacciones con la RNasa III de *E. coli*

Las reacciones con la RNasa III de *E. coli* (Ec-RNasa III) se llevaron a cabo en un volumen final de 10 μ l. Por un lado se desnaturalizó el RNA sustrato, a 0'6 nM final, en agua durante 1 minuto a 90°C y por otro lado se calentó el tampón P 1X (apartado M.1.2.3) también 1 minuto a 90°C. Se mezclaron y se dejó renaturalizar 20 minutos a temperatura ambiente. Tras este tiempo se añadió 2 μ g de tRNA de levadura (Ambion), 2 U/ μ l de RNasin (Promega) y la Ec-RNasa III (Ambion) cuya concentración final en la reacción fue diferente en cada caso. La reacción fue incubada 1 hora a 37°C y se detuvo por enfriamiento en hielo y con tampón de carga para geles de poliacrilamida desnaturalizante (apartado M.1.2.8). Los productos de reacción se resolvieron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (apartado M.2.9.2), se expusieron con una película de doble emulsión Super RX (FUJIFILM) y fueron visualizados utilizando la máquina reveladora Curix 60 (Agfa).

M.2.12.2.- Reacciones con la RNasa III eucariota Dicer

Las reacciones con la enzima Dicer se llevaron a cabo utilizando el kit de la enzima recombinante humana Dicer de Genlantis con algunas modificaciones tanto en el protocolo como en los reactivos que suministra el fabricante. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 10 μ l en un tampón de reacción 1X que contenía 300 mM de NaCl, 20 mM HEPES, 5 mM $MgCl_2$ y 50 mM Tris-HCl pH 8. Se añadió el RNA sustrato a una concentración final de 0'6 nM, 1 mM de ATP, 2 U/ μ l de RNasin (Promega) y 0'5 U de Dicer (Genlantis). La reacción fue incubada 2 horas a 37°C y se detuvo por enfriamiento en hielo. Tras la incubación, la reacción fue tratada con proteinasa K (apartado M.2.13.1). Los productos de reacción se resolvieron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes al 4% (apartado M.2.9.2), se expusieron con una película de doble emulsión Super RX (FUJIFILM) y se visualizaron utilizando la máquina reveladora Curix 60 (Agfa).

M.2.12.3.- Reacciones con la subunidad RNA de la RNasa P de la cianobacteria *Synechocystis* sp. PPC 6803 (Rz6803)

El RNA de la RNasa P de la cianobacteria *Synechocystis* sp. PPC 6803 (Rz6803) se obtuvo como se describe en el apartado M.1.4.2.1 y se utilizó en las reacciones a una concentración final de 67'5 nM. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 10 μ l. El Rz6803 fue incubado 15 minutos a 37°C en presencia del tampón de reacción cyano 1X (apartado M.1.2.5), RNasin (Promega) 2 U/ μ l y un 4% de PEG. Tras esta incubación de 15 minutos, se añadió a la mezcla de reacción el RNA sustrato a una concentración final de 1'8 nM. La reacción fue incubada 1 hora a 37°C y se detuvo en hielo y con tampón de carga para geles de poliacrilamida desnaturalizantes (apartado M.1.2.8). Antes de cargar las muestras en el gel de poliacrilamida, se les añadió 2 μ g de tRNA de levadura (Ambion). Los productos de reacción se resolvieron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes, se expusieron con una película de doble emulsión Super RX (FUJIFILM) y se visualizaron utilizando la máquina reveladora Curix 60 (Agfa).

M.2.12.4.- Reacciones con la RNasa P humana

La RNasa P humana fue purificada a partir de 30 g de células HeLa según Bartkiewicz *et al.* [Bartkiewicz *et al.*, 1989] con algunas modificaciones. La reacción en la que se utilizó este extracto con actividad RNasa P se llevó a cabo en un volumen final de 10 μ l. El RNA sustrato a una concentración final de 0'9 nM y el tampón P 1X (apartado M.1.2.3) fueron calentados 1 minuto a 90°C, ambos por separado, y se mezclaron. Tras dejar la mezcla 20 minutos a temperatura ambiente, se añadió 4% de PEG, 2 U/ μ l de RNasin (Promega) y 0'5 μ l del extracto con actividad RNasa P. La reacción fue incubada 30 minutos a 30°C. Tras la incubación, la reacción fue tratada con proteinasa K (apartado M.2.13.1). Los productos de reacción se resolvieron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes al 4% (apartado M.2.9.2), se expusieron con una película de doble emulsión Super RX (FUJIFILM) y se visualizaron utilizando la máquina reveladora Curix 60 (Agfa).

En todas las reacciones anteriores en las que se utilizó un RNA competidor del corte, éste se añadió a la mezcla de reacción justo antes de la enzima. El gel fue secado a 80°C en condiciones de vacío, se expuso con una pantalla *Storage Phosphor Screen* (GE Healthcare) y se escaneó utilizando el equipo Typhoon 9400 (Amersham Biosciences). El corte se cuantificó utilizando el programa ImageQuant 5.2.

M.2.13.- OTRAS REACCIONES

M.2.13.1.- Proteinasa K

Por cada 10 μ l de reacción a tratar con proteinasa K se añadió 5 μ g de tRNA de levadura (Ambion), 0'7 μ l de SDS al 10%, 0'7 μ l de EDTA 100 mM y 0'6 μ g de proteinasa K (Ambion) previamente activada. Esta mezcla de reacción se incubó 12 minutos a 63°C.

La activación de la proteinasa K (Ambion) se llevó a cabo calentando 5 minutos a 63°C 20 μ g de proteinasa K (Ambion) en un volumen final de 20 μ l con agua.

M.2.13.2.- Circularización de fragmentos de RNA con extremos 5'-fostato y 3'-hidroxilo

La reacción para la circularización de moléculas de RNA con extremos 5'-fostato y 3'-hidroxilo se llevó a cabo en un volumen final de 10 µl utilizando la enzima T4 RNA ligasa de Promega. Una fracción del RNA disponible se incubó con el tampón de la casa comercial a 1X, 0'01% de BSA, 1% de PEG, 2 U/µl de RNasin (Promega) y 1 U/µl de T4 RNA ligasa (Promega). La reacción se incubó aproximadamente 60 horas a 4°C. Tras este tiempo, las reacciones fueron tratadas con proteinasa K (apartado M.2.13.1).

M.2.13.3.- Desfosforilación y fosforilación de un RNA

Las reacciones de desfosforilación se llevaron a cabo en un volumen final de 10 µl y utilizando la enzima fosfatasa alcalina de gamba (USB). La mezcla de reacción incluyó una fracción del RNA disponible, el tampón de reacción suministrado por la casa comercial a 1X y la enzima a 0'1 U/µl. La reacción fue incubada 30 minutos a 37°C y la enzima se inactivó 15 minutos a 65°C. La reacción fue precipitada y resuspendida en 10 µl de agua antes de realizar la fosforilación del RNA.

La reacción de fosforilación también se realizó en un volumen final de 10 µl. En este caso se utilizó la enzima T4 polinucleótido kinasa (T4 PNK) de NEB en una mezcla de reacción que contenía 5 µl de la reacción de desfosforilación anterior, el tampón suministrado por la casa comercial a 1X, 10 µCi de [γ -³²P]-ATP 6000 Ci/mmol, 10 mCi/ml (Perkin Elmer) y 1 U/µl de la T4 PNK (NEB). La reacción fue incubada 7 minutos a 37°C y precipitada.

M.2.13.4.- Reacciones de retrotranscripción

La reacción de transcripción inversa o retrotranscripción (RT) se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl utilizando la enzima transcriptasa inversa de Roche. Una fracción del RNA disponible fue desnaturalizada junto con el oligodesoxirribonucleótido correspondiente a 1 µM durante 1 minuto a 90°C. Se le añadió el tampón suministrado por la casa comercial (Roche) a 1X y, tras 15 minutos a temperatura ambiente, se le

añadió 1 U/μl de RNasin (Promega), dNTPs (NEB) 1 mM cada uno, 10 ng/μl de RNA MS2 (Roche) y 0'5 U/μl de la enzima RT (Roche). La reacción fue incubada 30 minutos a 55°C y finalmente se inactivó la enzima calentando 5 minutos a 85°C.

M.2.13.5.- 5' Rapid Amplification of cDNA Ends (5' RACE)

1º Síntesis de la hebra de cDNA

La síntesis de la hebra de cDNA se llevó a cabo tal y como se describe en el apartado M.12.13.4.

2º Purificación

La purificación de la hebra de cDNA resultante del paso anterior se llevó a cabo con el kit de purificación para productos de PCR (Roche) con algunas modificaciones en el protocolo que suministra el fabricante y que se detallan a continuación. A los 20 μl de la reacción de RT se le añadieron 100 μl del tampón de unión. Se mezcló bien y se introdujo en el reservorio de la columna del kit. Se centrifugó 30 segundos a 8000 x g y se descartó el líquido recogido. Se añadieron 500 μl del tampón de lavado al reservorio y se centrifugó 30 segundos a 8000 x g. Se descartó el líquido recogido y el reservorio se volvió a lavar con 200 μl del tampón de lavado. Se centrifugó 2 minutos a 13000 x g y se descartó el líquido recogido. El reservorio se introdujo en un nuevo tubo de 1'5 ml y se añadió 50 μl de tampón de elución. Se centrifugó 30 segundos a 8000 x g y se recogió la hebra de cDNA eluída.

3º Adición de la cola poli(A)

La adición de la cola poli(A) a la hebra de cDNA se realizó utilizando la enzima recombinante terminal transferasa de Roche en un volumen final de 30 μl. Para ello, 19 μl de la hebra de cDNA purificada fueron mezclados con el tampón 1X y 2 mM de CoCl₂ suministrados por la casa comercial, 0'16 mM de dATP (Roche) y 8 U/μl de la Terminal Transferasa. La reacción fue incubada 25 minutos a 37°C y la enzima fue inactivada 10 minutos a 70°C.

4º PCR

La reacción de amplificación de DNA mediante PCR fue llevada a cabo según el protocolo descrito en el apartado M.2.7.2 utilizando los cebadores adecuados.

M.2.14.- DIGESTIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

M.2.14.1.- Digestión del DNA

M.2.14.1.1.- Enzimas de restricción

Los DNAs plasmídicos se linearizaron utilizando las enzimas de restricción correspondientes y según las condiciones especificadas por el fabricante en cuanto a tampón de reacción y temperatura. Por lo general se utilizaron 10 unidades de enzima por cada μg de DNA. El tiempo de incubación varió entre 2 horas y toda la noche hasta que no se detectaron moléculas sin digerir. La digestión del DNA mediante enzimas de restricción se comprobó visualizando una alícuota de reacción en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio (apartado M.2.9.1).

Las digestiones en las que era necesario utilizar dos enzimas de restricción se realizaron simultáneamente en todos los casos ya que las condiciones de reacción de ambas enzimas lo permitieron.

M.2.14.1.2.- RQ1 DNasa

La RQ1 DNasa (Promega) se utilizó para eliminar el DNA molde empleado en las reacciones de transcripción *in vitro*. Una vez finalizada la síntesis del RNA, se añadió a la reacción de transcripción 1 U de RQ1DNasa (Promega) por μg de DNA molde y la reacción se incubó 15 minutos a 37°C.

M.2.14.2.- Digestión del RNA

En esta memoria se han empleado una serie de nucleasas con distinta especificidad para regiones de simple y doble cadena del RNA:

- RNasa T1: La RNasa T1 fue utilizada para determinar regiones de simple cadena en el RNA.

La RNasa T1 es una endoribonucleasa específica de guanina (G). Cataliza la hidrólisis de puentes fosfodiéster en el RNA de simple cadena en 3' de residuos de G produciendo extremos 3'-fosfato [Eun, 1996].

- RNasa V1: La RNasa V1 se utilizó para determinar las regiones del RNA que se encuentran apareadas en la estructura. La RNasa V1 procesa hélices de RNA en doble cadena (con un mínimo aproximado de unas 4-5 pares de bases) sin preferencia de secuencia. Esta ribonucleasa puede reconocer también regiones helicoidales de una estructura *pseudoknot* [Knapp, 1989].

- RNasa A: La RNasa A fue utilizada para determinar regiones de simple cadena en el RNA. La RNasa A es una endoribonucleasa específica de bases pirimidínicas (C y U). La enzima corta puentes fosfodiéster del RNA en 3' de residuos C y U produciendo extremos 3'-fosfato y 5'-hidroxilo [Eun, 1996].

Las condiciones de reacción para cada una de estas nucleasas se detallan a continuación:

M.2.14.2.1.- RNasa T1

Las reacciones de degradación parcial para la determinación de la estructura secundaria del RNA con la RNasa T1 en condiciones nativas se llevaron a cabo en un volumen final de 10 µl. Unas 150 cpm de RNA sustrato y el tampón P 1X (apartado M.1.2.3) se calentaron por separado 1 minuto a 90°C y se mezclaron. Tras 15 minutos a temperatura ambiente se añadió 2'5 µg de tRNA de levadura (Ambion) y la RNasa T1 (Calbiochem). La enzima fue calibrada para cada sustrato y se utilizó a 0'001 µg/µl en el caso del RNA WNV 440-690, y a 0'0005 ng/µl en el caso del RNA WNV 1-702.

La mezcla de reacción se incubó 20 minutos a 37°C y se paró inmediatamente en un baño de nieve carbónica en etanol.

Las reacciones de degradación parcial con la RNasa T1 en condiciones desnaturizantes se llevaron a cabo en un volumen final de 10 µl. Unas 300 cpm de RNA sustrato se mezcló con 1'5 µg de tRNA de levadura (Ambion), 6 µl de tampón para la degradación con RNasa T1 en condiciones desnaturizantes (apartado M.1.2.7) y la RNasa T1 (Calbiochem). La enzima fue calibrada para cada sustrato y se utilizó a 0'005 µg/µl para cada uno de ellos. La reacción fue incubada 5 minutos a 55°C y fue parada inmediatamente en un baño de nieve carbónica en etanol.

M.2.14.2.2.- RNasa V1

Las reacciones de degradación parcial para la determinación de la estructura secundaria del RNA con la RNasa V1 en condiciones nativas se llevaron a cabo en un volumen final de 10 µl. Unas 150 cpm de RNA sustrato y el tampón P 1X (apartado M.1.2.3) fueron calentados por separado 1 minuto a 90°C, se mezclaron y tras 15 minutos a temperatura ambiente se añadió a la mezcla 2'5 µg de tRNA de levadura (Ambion) y la RNasa V1 (Ambion). La enzima fue calibrada para cada sustrato y se utilizó a 0'001 U/µl para cada uno de ellos. La mezcla de reacción se incubó 30 minutos a 37°C y se paró inmediatamente en un baño de nieve carbónica en etanol.

M.2.14.2.3.- RNasa A

Las reacciones de degradación parcial para la determinación de la estructura secundaria del RNA con la RNasa A en condiciones nativas se llevaron a cabo en un volumen final de 5 µl. Unas 150 cpm de RNA sustrato y el tampón P 1X (apartado M.1.2.3) se calentaron por separado 1 minuto a 90°C y se mezclaron. Tras 15 minutos a temperatura ambiente se añadió 1'5 µg de tRNA de levadura (Ambion) y la RNasa A (Ambion). La enzima fue calibrada para cada sustrato y se utilizó a 0'001 ng/µl para cada uno de ellos. La mezcla de reacción se incubó 2 minutos a 37°C y se paró inmediatamente en un baño de nieve carbónica en etanol.

M.2.14.2.4.- Hidrólisis alcalina del RNA

La hidrólisis alcalina del RNA se realizó con una solución de carbonato-bicarbonato sódico 0'1 M a pH 9'5 (apartado M.1.2.6). Unas 300 cpm de RNA sustrato se trataron con 0'5 µl de esta solución alcalina en un volumen final de reacción de 10 µl en la que también se añadió 1 µg de tRNA de levadura (Ambion). La mezcla de reacción se incubó 60 segundos a 95°C y se paró inmediatamente en un baño de nieve carbónica en etanol.

M.2.15.- MICROARRAYS

Oligonucleótidos

Para la construcción de los microarrays se diseñaron 35 oligonucleótidos de DNA complementarios a la región que comprende los primeros 700 nucleótidos del genoma del WNV. Todos los oligonucleótidos se diseñaron con 20 nucleótidos complementarios a la secuencia del WNV, se sintetizaron (Sigma-Aldrich) con un grupo amino NH₂(CH₂)₆ en su extremo 5' seguido por un espaciador (dT)₁₅, y fueron purificados por HPLC. La identificación numérica de cada oligo indica el número de nucleótido en la posición 5' de la secuencia original del WNV (apartado M.1.5). Como controles negativos de la señal de hibridación se incluyeron dos oligonucleótidos sin homología de secuencia al WNV: uno complementario al extremo 5' del HCV denominado 1b-24 (5'-(T)₁₅GGGAGTGATCTATGGTGGAG-3') y otro a la región RT del gen pol del HIV-1 denominado S69R70 (5'-(T)₁₅ACAGTTCTAGATGGA-3').

Los oligonucleótidos se imprimieron en un soporte de vidrio modificado con grupos epoxi (SuperEpoxy 2 substrate slides, Telechem-Arrayit) utilizando un GMS 417 Arrayer (Genetic MicroSystems Affymetrix). Los oligos se diluyeron a dos concentraciones diferentes (5 y 20 µM) en la solución para el punteado de Telechem-Arrayit Micro Spotting Solution para mejorar la unión del DNA al soporte. Cada concentración de oligo se imprimió por triplicado en puntos de 150 µm de diámetro, con una distancia de 150 µm entre los replicados y 300 µm entre cada triplicado.

Marcaje del RNA

Para cada reacción, 1 µg de RNA WNV 1-702, obtenido mediante transcripción *in vitro*, fue incubado en el tampón de marcaje del kit ULYSIS Alexa Fluor 647 (Invitrogen) en un volumen final de 30 µl durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente fueron añadidos 2 µl del reactivo fluorescente Ulysis Alexa 647 y se incubó 10 minutos a 90°C. La reacción se detuvo en hielo durante aproximadamente 10 minutos. La purificación del RNA marcado se llevó a cabo utilizando las columnas de purificación Microcon (Millipore).

Hibridación

Un paso previo a la hibridación del RNA marcado consistió en tratar las placas de microarrays para eliminar las moléculas de DNA no unidas a la superficie y el exceso de sales de la solución para el punteado (Micro Spotting Solution). Los soportes impresos fueron lavados en SSC 2X, 0'1% de N-Lauroylsarcosina (Sigma-Aldrich) durante 2 minutos a temperatura ambiente, seguido por un lavado adicional en SSC 2X. Posteriormente, los oligos impresos fueron desnaturalizados con agua a 100°C durante 2 minutos, enfriados 10 segundos a temperatura ambiente y fijados inmediatamente con etanol al 100% durante 2 minutos a 4°C.

Los microarrays fueron prehibridados en SSC 6X, SDS 0'5% y 10 µg/µl de BSA durante 45 minutos a 42°C. Y, posteriormente, lavados con agua durante 5 minutos. La hibridación del RNA marcado se llevó a cabo en condiciones no desnaturalizantes. Se hibridaron 300 ng de RNA marcado en un tampón no desnaturalizante (100 mM HEPES pH 7'5, 6mM MgCl₂, 100 mM NaCl) durante 2 horas a 37°C en la cámara de hibridación (Genetix). Tras la incubación, los microarrays fueron lavados a temperatura ambiente, primero en el tampón de lavado (20 mM HEPES pH 7'5, 6 mM MgCl₂, 50 mM NaCl) en presencia de SDS 0'2% durante 15 minutos y, posteriormente, en solución de lavado sin SDS otros 15 minutos. Los soportes fueron secados por centrifugación 1 minuto a 500 g e inmediatamente escaneados utilizando el escáner Genepix 4100. Los datos fueron tratados utilizando el programa Genepix pro 6.0.

Se cuantificó la señal de hibridación para tres experimentos independientes. En todos los casos, la señal de fluorescencia fue corregida eliminando la señal de fondo y fue normalizada respecto a la señal del oligonucleótido 101.

R.-RESULTADOS

R.1.- RNasa III

R.1.1.- RNasa III de *Escherichia coli*

R.1.1.1.- Ensayo de actividad sobre el RNA WNV 1-702

Se probó la actividad de la RNasa III de *E. coli* (Ec-RNasa III) sobre un fragmento de RNA que contiene los primeros 702 nucleótidos del genoma del WNV (RNA WNV 1-702, apartado M.1.4.1.1) *in vitro*. Para ello, el RNA WNV 1-702, marcado a lo largo de toda la cadena con [α - 32 P]-GTP (RNA WNV 1-702 $^{\alpha^{32}\text{P-GTP}}$) y a una concentración final de 0'6 nM, fue incubado en presencia de la Ec-RNasa III tal y como se detalla en el apartado M.2.12.1. Se utilizó un rango de concentraciones finales para la Ec-RNasa III que iba de 0'00005 U/ μ l a 0'005 U/ μ l. Como control positivo de la reacción de corte con la Ec-RNasa III se utilizó un RNA marcado a lo largo de toda la cadena con [α - 32 P]-GTP que contenía los primeros 570 nucleótidos del genoma del virus de la hepatitis C (RNA HCV 1-570 $^{\alpha^{32}\text{P-GTP}}$) y cuyo patrón de corte con Ec-RNasa III a una concentración final de 0'0005 U/ μ l ya ha sido caracterizado previamente [Beguiristain *et al.*, 2005].

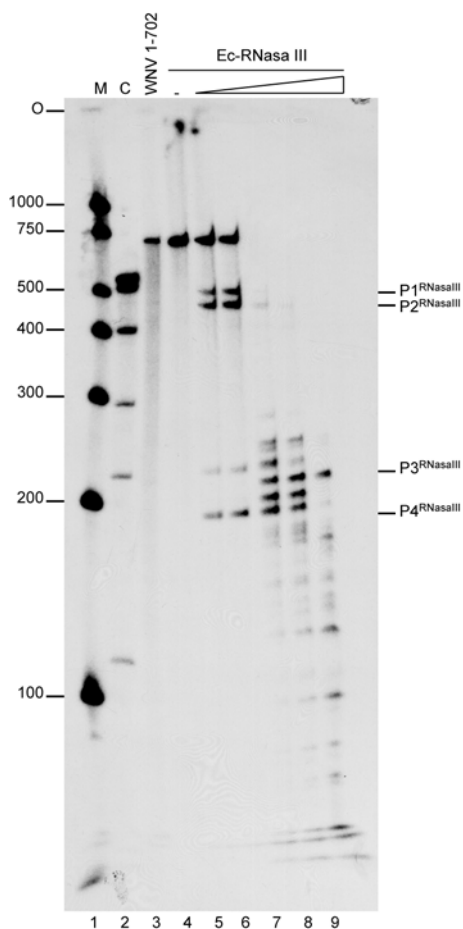
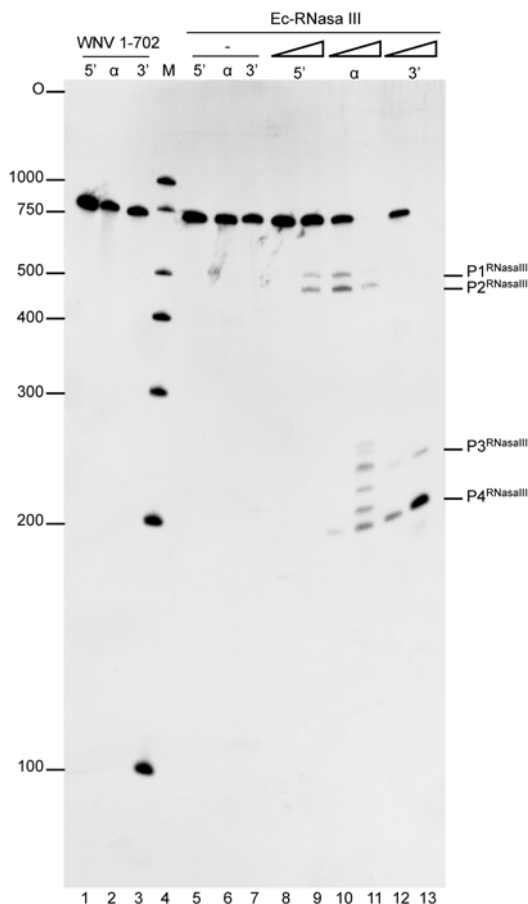


Fig. R.1.- Actividad de la Ec-RNasa III sobre el RNA WNV 1-702. Autorradiografía de un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 4% que muestra la actividad de la Ec-RNasa III sobre el RNA WNV 1-702^{α32P-GTP}. Carril 1 (M), patrón de peso molecular de RNA en número de bases. Carril 2 (C), control positivo de corte para la Ec-RNasa III sobre el RNA HCV 1-570^{α32P-GTP} a una concentración de Ec-RNasa III de 0'0005 U/μl. Carriles 3 y 4, RNA WNV 1-702^{α32P-GTP} incubado en hielo y en tampón de reacción respectivamente. Carriles 5-9, RNA WNV 1-702^{α32P-GTP} incubado en presencia de concentraciones crecientes de Ec-RNasa III (0'00005, 0'0001, 0'0005, 0'001 y 0'005 U/μl consecutivamente). O, indica el origen de la migración electroforética. Los productos de digestión P1^{RNasaIII} a P4^{RNasaIII} se indican en el margen del gel.

La incubación del RNA WNV 1-702^{α32P-GTP} con diferentes concentraciones de Ec-RNasa III da lugar a una serie de productos de corte que se muestran en la figura R.1. A las concentraciones más bajas de Ec-RNasa III utilizadas (0'00005 U/μl y 0'0001 U/μl, carriles 5 y 6), el RNA WNV 1-702^{α32P-GTP} es procesado para dar lugar a cuatro bandas producto que hemos designado e indicado en la figura como bandas producto P1^{RNasaIII}, P2^{RNasaIII}, P3^{RNasaIII} y P4^{RNasaIII}. Estos cuatro productos de reacción serán motivo de estudio en esta memoria de Tesis Doctoral. Al ir aumentando la concentración de enzima (carriles 7 a 9), la Ec-RNasa III reconoce otros sitios que no han sido caracterizados en este trabajo.

R.1.1.2.- Localización de los productos de corte en relación a los extremos 5' y 3' del RNA WNV 1-702

Para localizar la posición de los productos de corte en relación a los extremos del RNA WNV 1-702, se identificó qué productos conservan el extremo 5' y 3' del RNA tras el corte por la Ec-RNasa III. Para ello se marcó el RNA WNV 1-702 en su extremo 5' con [γ - ^{32}P]-GTP (RNA WNV 1-702 $^{\gamma 32\text{P-GTP}}$), a lo largo de toda su cadena con [α - ^{32}P]-GTP (RNA WNV 1-702 $^{\alpha 32\text{P-GTP}}$), y en su extremo 3' con [$5'$ - ^{32}P]-pCp (RNA WNV 1-702 $^{32\text{P-pCp}}$). Los marcajes del RNA se realizaron como se describe en el apartado M.2.8. Aproximadamente 500 cpm de cada uno de los RNAs anteriores fueron incubados con dos concentraciones de Ec-RNasa III (0'0001 U/ μl y 0'0005 U/ μl) tal y como se detalla en el apartado M.2.12.1.



Como se muestra en la figura R.2, la digestión del RNA WNV 1-702 $^{\alpha 32\text{P-GTP}}$ con la Ec-RNasa III dio lugar a las cuatro bandas producto P1 $^{\text{RNasIII}}$, P2 $^{\text{RNasIII}}$, P3 $^{\text{RNasIII}}$ y P4 $^{\text{RNasIII}}$; la digestión del RNA WNV 1-702 $^{\gamma 32\text{P-GTP}}$ con la Ec-RNasa III dio lugar a las bandas producto P1 $^{\text{RNasIII}}$ y P2 $^{\text{RNasIII}}$, y la digestión del RNA WNV 1-702 $^{32\text{P-pCp}}$ con la Ec-RNasa III dio lugar a las bandas producto P3 $^{\text{RNasIII}}$ y P4 $^{\text{RNasIII}}$. Estos resultados indican que las bandas producto P1 $^{\text{RNasIII}}$ y P2 $^{\text{RNasIII}}$ conservan el extremo 5' del RNA WNV 1-702, mientras que las bandas producto P3 $^{\text{RNasIII}}$ y P4 $^{\text{RNasIII}}$ conservan el extremo 3' del RNA WNV 1-702.

Fig. R.2.- Localización de los productos de corte en relación a los extremos 5' y 3' del RNA WNV 1-702. Autorradiografía de un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 4% que muestra el patrón de corte de la Ec-RNasa III en el RNA WNV 1-702 $^{\gamma 32\text{P-GTP}}$, RNA WNV 1-702 $^{\alpha 32\text{P-GTP}}$ y RNA WNV 1-702 $^{32\text{P-pCp}}$. Carriles 1, 5, 8 y 9: muestran el RNA WNV 1-702 $^{\gamma 32\text{P-GTP}}$ incubado en hielo, en tampón de reacción, con 0'0001 U/ μl y con 0'0005 U/ μl de Ec-RNasa III respectivamente. Carriles 2, 6, 10 y 11: muestran el RNA WNV 1-702 $^{\alpha 32\text{P-GTP}}$ incubado en hielo, en tampón de reacción, con 0'0001 U/ μl y con 0'0005 U/ μl de Ec-RNasa III

respectivamente. Carriles 3, 7, 12 y 13: muestran el RNA WNV 1-702^{32P-pCp} incubado en hielo, en tampón de reacción, con 0'0001 U/μl y con 0'0005 U/μl de Ec-RNasa III respectivamente. Carril 4 (M), patrón de peso molecular de RNA en número de bases. O, indica el origen de la migración electroforética. Los productos de digestión P1^{RNasaIII} a P4^{RNasaIII} se indican en el margen del gel.

R.1.1.3.- Caracterización de la especificidad del corte

Para garantizar que los productos de corte observados tras la incubación del RNA WNV 1-702 con la Ec-RNasa III son producidos por esta RNasa, y no por alguna actividad RNasa no deseada de la enzima recombinante o por una contaminación en el extracto comercial, se utilizaron dos estrategias. Una de ellas consistió en una serie de ensayos de competición enzimática con sustratos específicos de la Ec-RNasa III. La otra estrategia consistió en el estudio de la naturaleza química de los nuevos extremos generados tras el corte y que son característicos para la Ec-RNasa III.

R.1.1.3.1.- Competiciones enzimáticas

La Ec-RNasa III es una endoribonucleasa específica de RNA doble cadena (dsRNA). Por ello, las competiciones enzimáticas se llevaron a cabo con una serie de sustratos de dsRNA que son reconocidos específicamente por esta ribonucleasa. Los sustratos de dsRNA que se utilizaron en este estudio fueron el RNA sintético poli(I).poli(C), y los sustratos naturales RNA R1.1 del fago T7 y el RNA del virus L-A.

Se llevaron a cabo dos tipos de inhibiciones competitivas:

R.1.1.3.1.1.- Inhibición competitiva directa

En este tipo de experimentos se incubó una cantidad constante del RNA WNV 1-702, marcado internamente con $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP}$, con una concentración de Ec-RNasa III que fue calibrada previamente para trabajar en condiciones de reacción no saturantes, y con cantidades crecientes de RNA poli(I).poli(C) o dsRNA L-A sin marcaje radiactivo.

► El RNA sintético de doble cadena poli(I).poli(C) (Sigma-Aldrich) se comercializa como una mezcla de RNAs de diferente longitud y peso molecular, por lo que las reacciones de competición con este RNA se realizaron en relación de peso. Una cantidad constante de 1'4 ng (el equivalente a 0'6 nM) de RNA WNV 1-702^{α32P-GTP} fue incubada con una concentración final de Ec-RNasa III de 0'0001 U/μl y con cantidades crecientes (0'14, 0'28, 1'4, 2'8 y 14 ng) de RNA poli(I).poli(C). La inspección visual del resultado, que se muestra en la figura R.3.A, revela que la intensidad de todas las bandas producto decrece de forma similar al incubar el RNA WNV 1-702 con el competidor. El corte se redujo aproximadamente a la mitad cuando la incubación se realizó con 2'8 ng de RNA poli(I).poli(C) (carril 8).

► El virus L-A es un RNA de doble cadena de 4'6 Kb comúnmente encontrado en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* [Wickner, 2007]. Este RNA se obtuvo como se detalla en el apartado M.2.5. El RNA WNV 1-702^{α32P-GTP} a una cantidad constante de 1'4 ng fue incubado con 0'0001U/μl de Ec-RNasa III y cantidades crecientes del RNA L-A (1'4, 14, 140 y 275 ng). La inspección visual del resultado (Fig. R.3.B) revela que la intensidad de todas las bandas producto decrece de forma similar al incubar el RNA WNV 1-702 con el competidor. El corte se redujo a más de la mitad cuando el RNA WNV 1-702 fue incubado con la misma cantidad en peso del RNA L-A (carril 5).

R.1.1.3.1.2.- Inhibición competitiva reversa

En este tipo de ensayos se probó la habilidad del RNA WNV 1-702 para competir la actividad de la Ec-RNasa III sobre el transcrito R1.1 del fago T7 (apartado I.3.1, Fig. I.7.B). Las reacciones de competición se llevaron a cabo con el RNA R1.1 (apartado M.1.4.3), marcado internamente con [α-³²P]-GTP y a una concentración constante de 0'6 nM final, incubado con 0'0002 U/μl de Ec-RNasa III (calibrada previamente para trabajar en condiciones de reacción no saturantes) y concentraciones crecientes (4'3, 43, 215, 400 y 1100 nM) de RNA WNV 1-702 sin marcaje radiactivo. El resultado (Fig. R.3.C) muestra que el RNA WNV 1-702 compite el corte del RNA R1.1 por la Ec-RNasa III. El corte queda inhibido casi completamente a un ratio de concentración 1:70 de RNA R1.1:WNV 1-702 (carril 5). La acumulación de material radiactivo en los pocillos del gel de los carriles 5-8 se debe probablemente a la generación de complejos a altas concentraciones de RNA.

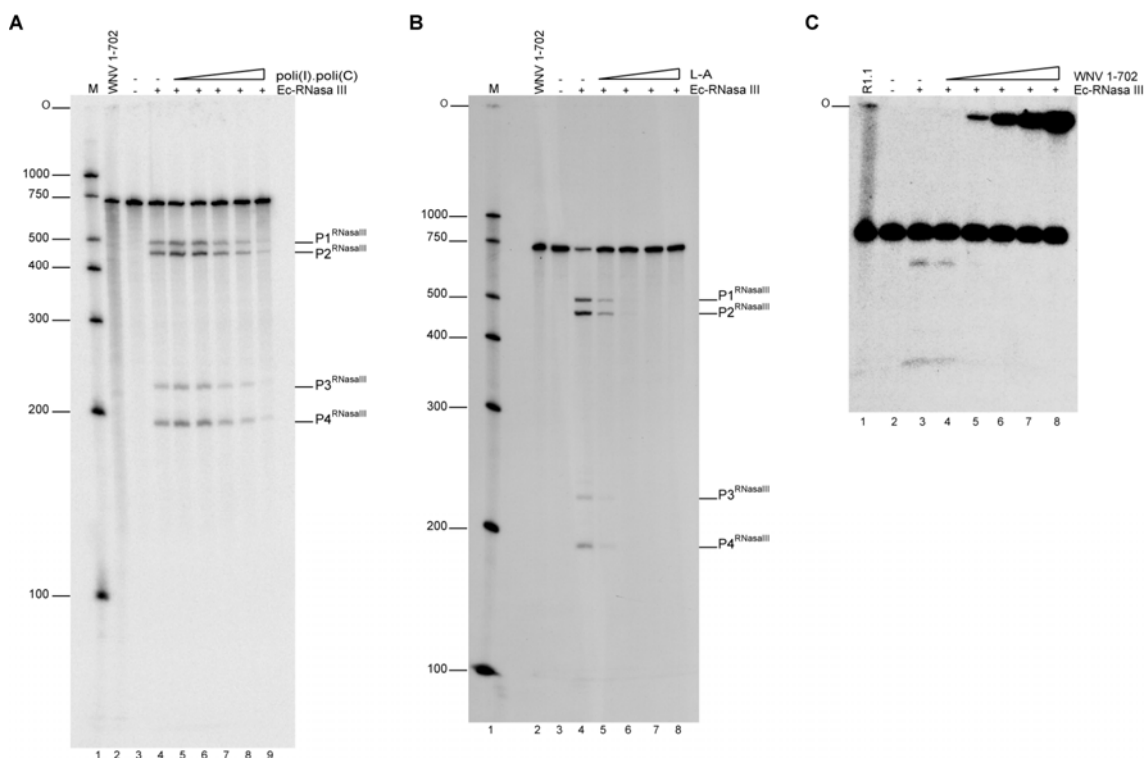


Fig. R.3.- Ensayos de competición. (A y B) El dsRNA compete e inhibe el corte del RNA WNV 1-702^{α32P-GTP} por la Ec-RNasa III. Los productos de digestión P1^{RNasaIII} a P4^{RNasaIII} se indican en el margen de cada gel. **(A)** Autoradiografía de un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 4% que muestra la competición con el RNA poli(I).poli(C). Carril 1 (M), patrón de peso molecular de RNA en número de bases. Carriles 2, 3 y 4; RNA WNV 1-702^{α32P-GTP} incubado en hielo, en tampón de reacción, y con 0'0001 U/μl de Ec-RNasa III respectivamente. Carriles 5-9, reacciones de competición en las que 1'4 ng de RNA WNV 1-702^{α32P-GTP} fueron incubados con 0'0001 U/μl de Ec-RNasa III y cantidades crecientes de poli(I).poli(C) (0'14, 0'28, 1'4, 2'8 y 14ng consecutivamente). **(B)** Autoradiografía de un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 4% que muestra la competición con el RNA L-A. Carril 1 (M), patrón de peso molecular de RNA en número de bases. Carriles 2, 3 y 4; RNA WNV 1-702^{α32P-GTP} incubado en hielo, en tampón de reacción, y con 0'0001 U/μl de Ec-RNasa III respectivamente. Carriles 5-8, reacciones de competición en las que 1'4 ng de RNA WNV 1-702^{α32P-GTP} fueron incubados con 0'0001 U/μl de Ec-RNasa III y cantidades crecientes de RNA L-A (1'4, 14, 140 y 275ng consecutivamente). **(C)** El RNA WNV 1-702 compete e inhibe el corte del RNA R1.1^{α32P-GTP} por la Ec-RNasa III. Autoradiografía de un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 10%. Carriles 1, 2 y 3; R1.1^{α32P-GTP} incubado en hielo, en tampón de reacción, y con 0'0002 U/μl de Ec-RNasa III respectivamente. Carriles 4-8, reacciones de competición en las que el R1.1^{α32P-GTP} a 0'6 nM fue incubado con 0'0002 U/μl de Ec-RNasa III y concentraciones crecientes de RNA WNV 1-702 (4'3, 43, 215, 400, 1100 nM consecutivamente). O, indica el origen de la migración electroforética en los tres geles.

R.1.1.3.2.- Determinación de los grupos químicos de los nuevos extremos generados tras el corte

Una de las propiedades que distingue a la Ec-RNasa III de la mayoría de RNAsas no específicas de estructura es que, tras procesar un RNA, los nuevos extremos generados son 5'-fosfato y 3'-hidroxilo [Robertson and Dunn, 1975] mientras que la mayoría de las RNAsas contaminantes dejan extremos 5'-hidroxilo y 3'-fosfato, previo paso por un producto intermedio 2',3'-fosfato cíclico [Eun, 1996]. Utilizando esta propiedad, se llevaron a cabo una serie de experimentos para garantizar que los productos de corte observados tras la incubación del RNA WNV 1-702 con la Ec-RNasa III son específicos de esta ribonucleasa. Para ello se utilizaron las enzimas T4 RNA ligasa y T4 polinucleótido quinasa que reconocen específicamente los extremos del RNA. La enzima T4 RNA ligasa puede añadir [5'-³²P]-pCp al extremo 3'-hidroxilo de un RNA [England and Uhlenbeck, 1978] y también puede circularizar fragmentos de RNA con extremos 5'-fosfato y 3'-hidroxilo [Silber et al., 1972]. La enzima T4 polinucleótido quinasa (T4 PNK) cataliza la transferencia de un grupo ³²PO₄ desde la posición γ del ATP al extremo 5' de un RNA sólo si ese extremo es 5'-hidroxilo o ha sido desfosforilado previamente con un tratamiento con fosfatasa.

Como se vio en el apartado R.1.1.2, las bandas producto P1^{RNasalll} y P2^{RNasalll} conservan el extremo 5' del RNA WNV 1-702, mientras que las bandas producto P3^{RNasalll} y P4^{RNasalll} conservan el extremo 3' del RNA WNV 1-702. Teniendo ésto en cuenta, la enzima T4 polinucleótido quinasa fue utilizada para caracterizar los grupos químicos del nuevo extremo 5' de las bandas producto P3^{RNasalll} y P4^{RNasalll}. Y la enzima T4 RNA ligasa fue utilizada para caracterizar los grupos químicos del nuevo extremo 3' de las bandas producto P1^{RNasalll} y P2^{RNasalll} mediante la adición de [5'-³²P]-pCp, y del nuevo extremo 5' de las bandas producto P3^{RNasalll} y P4^{RNasalll} por circularización.

La cantidad necesaria de cada banda producto para la realización de este estudio enzimático se obtuvo escalando diez veces una reacción de corte estándar (apartado M.2.12.1) en la que el RNA WNV 1-702 marcado a lo largo de toda su cadena con [α-³²P]-GTP fue incubado con la Ec-RNasa III, los productos de reacción se resolvieron mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 4%, y las bandas producto P1^{RNasalll}, P2^{RNasalll}, P3^{RNasalll} y P4^{RNasalll} fueron recortadas del gel y eluidas (apartado M.2.10.2).

► Las bandas producto $P1^{RNasalll}$ y $P2^{RNasalll}$ fueron incubadas con la enzima T4 RNA ligasa (Promega) y $[5'-^{32}P]$ -pCp como se detalla en el apartado M.2.8.3. Como control se utilizó la misma cantidad de producto y las mismas condiciones de reacción pero sin incubar con la enzima. El resultado de este experimento se muestra en la figura R.4.A donde se puede observar que se produce una intensificación de las bandas producto que han sido tratadas con la enzima (carriles 2 y 4) con respecto al control sin tratar. Esto indica que se ha producido la adición de $[5'-^{32}P]$ -pCp al extremo 3' de la banda producto y que, por tanto, el nuevo extremo generado tras el corte se trata de un extremo 3'-hidroxilo para las bandas $P1^{RNasalll}$ y $P2^{RNasalll}$.

► Las bandas producto $P3^{RNasalll}$ y $P4^{RNasalll}$ fueron desfosforiladas con fosfatasa alcalina de gamba (USB) y, posteriormente, tratadas con la enzima T4 polinucleótido quinasa (NEB) y $[\gamma-^{32}P]$ -GTP como se indica en el apartado M.2.13.3. Como control se utilizó la misma cantidad de producto y las mismas condiciones de reacción pero sin una desfosforilación previa. El resultado (Fig. R.4.B) muestra la intensificación de las bandas producto $P3^{RNasalll}$ y $P4^{RNasalll}$ que han sido desfosforiladas previamente (carriles 3 y 5). Este resultado indica que se ha producido la incorporación de un grupo $^{32}PO_4$ desde la posición γ del GTP al extremo 5' de la banda producto y, por tanto, que el nuevo extremo generado tras el corte para las bandas producto $P3^{RNasalll}$ y $P4^{RNasalll}$ se trata de un extremo 5'-fosfato. También se comprobó dicho extremo utilizando la enzima T4 RNA ligasa (Promega). Como se dijo antes, la T4 RNA ligasa produce la circularización de fragmentos de RNA con extremos 5'-fosfato y 3'-hidroxilo. Tras incubar las bandas producto $P3^{RNasalll}$ y $P4^{RNasalll}$ con dicha enzima (apartado M.2.13.2), el resultado (Fig. R.4.C) muestra una migración electroforética más lenta del producto tratado con la T4 RNA ligasa (carriles 2 y 4), propia de una conformación circular en el RNA.

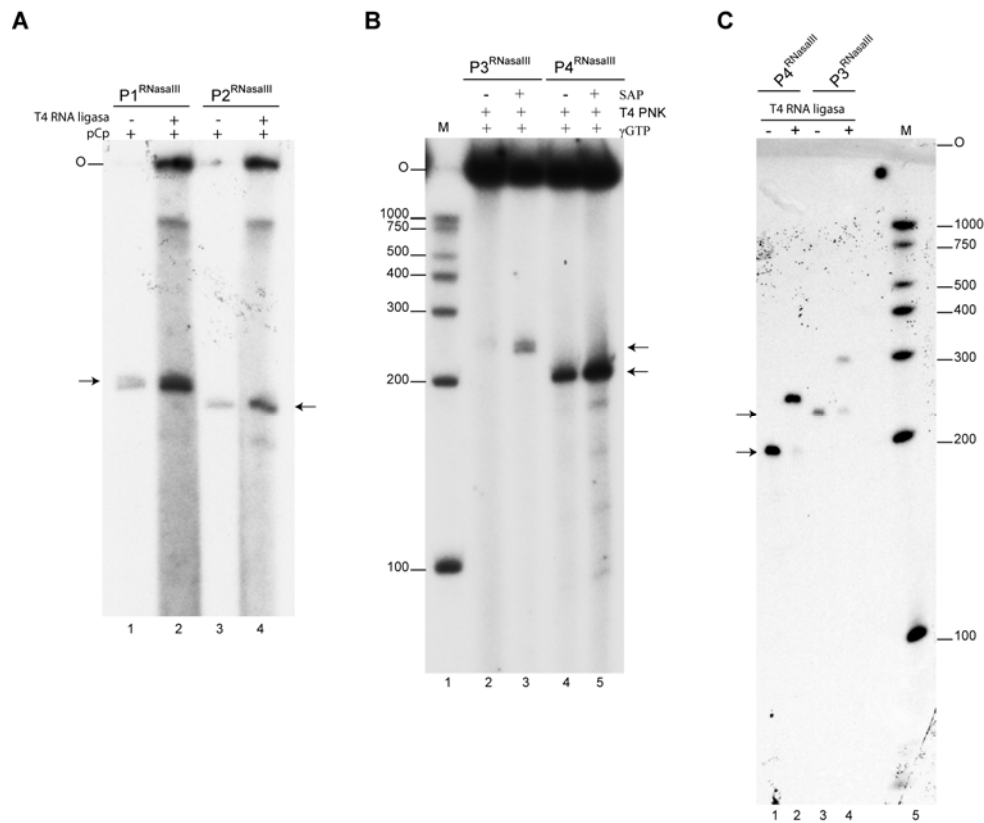
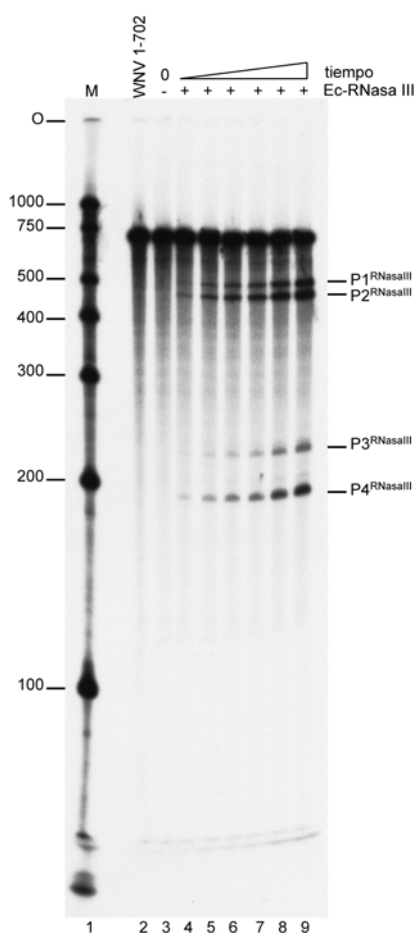


Fig. R.4.- Caracterización enzimática de los nuevos extremos generados tras la digestión del RNA WNV 1-702 por la Ec-RNasa III. Las bandas producto P1^{RNasalll}, P2^{RNasalll}, P3^{RNasalll} y P4^{RNasalll} fueron sometidas a diferentes reacciones enzimáticas para determinar los grupos químicos del (A) extremo 3'. Carriles 1 y 2; P1^{RNasalll} incubada con [5'-³²P]-pCp, sin T4 RNA ligasa (carril 1) o con T4 RNA ligasa (carril 2). Carriles 3 y 4; P2^{RNasalll} incubada con [5'-³²P]-pCp, sin T4 RNA ligasa (carril 3) o con T4 RNA ligasa (carril 4). (B) extremo 5'. Carril 1 (M), patrón de peso molecular de RNA en número de bases. Carriles 2 y 3; P3^{RNasalll} tratada con T4 polinucleótido quinasa y [γ-³²P]-GTP, sin tratamiento previo con fosfatasa (carril 2) o con tratamiento previo con fosfatasa (carril 3). Carriles 4 y 5; P4^{RNasalll} tratada con T4 polinucleótido quinasa y [γ-³²P]-GTP, sin tratamiento previo con fosfatasa (carril 4) o con tratamiento previo con fosfatasa (carril 5). (C) extremo 3' y 5' de las bandas producto P3^{RNasalll} y P4^{RNasalll}. Carriles 1 y 2, P4^{RNasalll} incubada en tampón de reacción (carril 1) y con T4 RNA ligasa (carril 2). Carriles 3 y 4, P3^{RNasalll} incubada con tampón de reacción (carril 3) y con T4 RNA ligasa (carril 4). Carril 5 (M), patrón de peso molecular de RNA en número de bases. O, indica el origen de la migración electroforética en los tres gels. La migración electroforética correspondiente a las bandas producto P1^{RNasalll}, P2^{RNasalll}, P3^{RNasalll} y P4^{RNasalll} se indica mediante flechas en cada gel.

R.1.1.4.- Cinética de corte

El patrón de corte generado por la Ec-RNasa III sobre el RNA WNV 1-702 fue estudiado a diferentes tiempos de reacción. Para ello, el RNA WNV 1-702, marcado internamente con $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP}$ y a una concentración final de 0'6 nM, fue incubado con la Ec-RNasa III a una concentración final de 0'00025 U/ μl . La reacción se llevó a cabo tal y como se indica en el apartado M.2.12.1, pero fue escalada a un volumen más grande. La mezcla de reacción fue incubada durante 60 minutos y se fueron sacando alícuotas a 0, 1, 5, 10, 15, 30 y 60 minutos (la alícuota $t=0$ se tomó justo antes de añadir la Ec-RNasa III).



En la figura R.5 se puede observar cómo ya desde el minuto 1 de reacción (carril 4) aparecen las cuatro bandas producto $P1^{RNasaIII}$, $P2^{RNasaIII}$, $P3^{RNasaIII}$ y $P4^{RNasaIII}$, y que estos productos de reacción aumentan proporcionalmente en el tiempo. Este resultado sugiere que los cortes que dan lugar a estas bandas producto se producen al mismo tiempo en el RNA sustrato.

Fig. R.5.- Cinética del corte del RNA WNV 1-702 por la Ec-RNasa III. Autoradiografía de un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 4% en el que se muestra una cinética de reacción para el corte del RNA WNV 1-702 $^{\alpha32P\text{-GTP}}$ por la Ec-RNasa III. Carril 1 (M), patrón de peso molecular de RNA en número de bases. Carril 2, RNA WNV 1-702 $^{\alpha32P\text{-GTP}}$ incubado en hielo. Carriles 3-9, muestran consecutivamente 0, 1, 5, 10, 15, 30 y 60 minutos de incubación del RNA WNV 1-702 $^{\alpha32P\text{-GTP}}$ con la Ec-RNasa III a 0'00025 U/ μl . O, indica el origen de la migración electroforética. Los productos de digestión $P1^{RNasaIII}$ a $P4^{RNasaIII}$ se indican en el margen del gel.

R.1.1.5.- Análisis del patrón de procesamiento del RNA WNV 1-702 por la Ec-RNasa III

El patrón de corte observado tras el procesamiento del RNA WNV 1-702 marcado a lo largo de toda su cadena con [α - 32 P]-GTP (RNA WNV 1-702 $^{\alpha 32P}$ -GTP) por la Ec-RNasa III para dar lugar a las cuatro bandas producto P1^{RNasaIII}, P2^{RNasaIII}, P3^{RNasaIII} y P4^{RNasaIII} (Fig. R.1, carriles 5 y 6) es probablemente consecuencia de dos cortes en el RNA sustrato. Se puede plantear que las parejas de bandas producto P1^{RNasaIII} (~500 nts) y P4^{RNasaIII} (~200 nts), por una parte, y P2^{RNasaIII} (~470 nts) y P3^{RNasaIII} (~230 nts), por otra, suman la longitud completa del RNA WNV 1-702. Sin embargo, se puede observar que la banda producto P1^{RNasaIII} aparece en menor proporción que la banda producto P4^{RNasaIII} aun cuando P1^{RNasaIII} es un fragmento de mayor longitud, indicando que la equimolaridad de los dos productos no se conserva. Además, la banda producto P1^{RNasaIII} también aparece en menor proporción que la banda producto P2^{RNasaIII} que migra justo por debajo. Las dos hipótesis que podrían explicar este fenómeno y que se muestran en la figura R.6 son:

Hipótesis 1.- En algunas moléculas del RNA WNV 1-702 se produce un corte para producir P1^{RNasaIII} y P4^{RNasaIII}, y, en otras, un corte para producir P2^{RNasaIII} y P3^{RNasaIII}. Sin embargo, parte de las moléculas correspondientes a P1^{RNasaIII}, debido probablemente a un cambio conformacional, son también reconocidas y procesadas para dar lugar a la banda producto P2^{RNasaIII}.

Hipótesis 2.- En algunas moléculas del RNA WNV 1-702 ocurre un solo corte para dar lugar a los productos P1^{RNasaIII} y P4^{RNasaIII}; en otras moléculas, un solo corte para dar lugar a los productos P2^{RNasaIII} y P3^{RNasaIII}; y en otras moléculas se producen ambos cortes, por lo que desaparecería así la banda producto P1^{RNasaIII}.

Ambas hipótesis implicarían un nuevo producto de digestión (indicado en la figura R.6 como PN^{RNasaIII}) que no se aprecia en el gel debido probablemente a que su tamaño es inferior a 40 nucleótidos.

Para comprobar ó descartar la hipótesis 1, se analizó la actividad de la Ec-RNasa III sobre el sustrato de longitud completa RNA WNV 1-702 y sobre la banda producto P1^{RNasaIII}. La cantidad necesaria de banda producto P1^{RNasaIII} se obtuvo escalando diez veces una reacción de corte estándar (apartado M.2.12.1) en la que se incubó el RNA WNV 1-702 marcado a lo largo de toda su cadena con [α - 32 P]-GTP con la Ec-RNasa III, los productos de reacción se resolvieron mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida desnaturizante al 4%, y la banda fue purificada del gel (apartado M.2.10.2). Tanto el RNA WNV 1-702 como la banda producto P1^{RNasaIII},

marcados internamente con $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP}$ y a una concentración final de 0'6 nM, fueron sometidos a una digestión con concentraciones crecientes (de 0'00005 a 0'005 U/ μl) de Ec-RNasa III. En la figura R.7 se puede observar que la incubación de la banda producto P1^{RNasaIII} con la Ec-RNasa III no da lugar a la banda producto P2^{RNasaIII}. Este resultado descarta la primera hipótesis y, por tanto, la formación de una estructura en la banda producto P1^{RNasaIII} reconocida y procesada por la Ec-RNasa III para dar lugar a la banda producto P2^{RNasaIII}. Una vez descartada la hipótesis 1, se puede concluir que el patrón de corte observado en el RNA WNV 1-702 por la Ec-RNasa III se debe a que se puede producir un solo corte o dos cortes ligados al mismo motivo estructural.

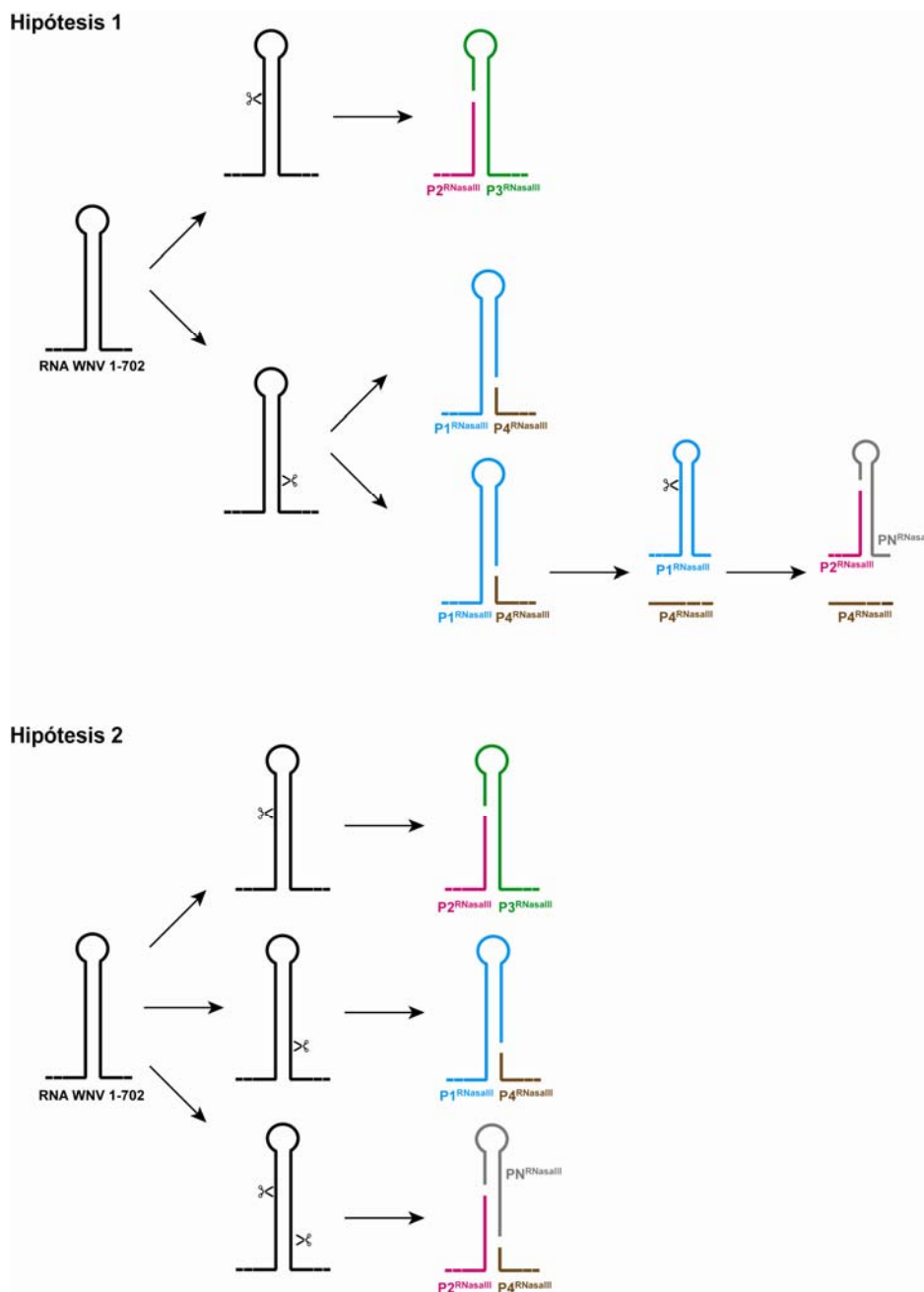


Fig. R.6.- Hipótesis propuestas para el patrón de procesamiento del RNA WNV 1-702 por la Ec-RNasa III. Cada hipótesis se representa esquemáticamente y muestra los cortes que se producirían en el motivo estructural del RNA WNV 1-702 reconocido por la Ec-RNasa III para dar lugar a los diferentes productos de reacción. Cada producto se representa con un color diferente: azul para P1^{RNasaIII}, rosa para P2^{RNasaIII}, verde para P3^{RNasaIII}, marrón para P4^{RNasaIII} y gris para PN^{RNasaIII}. Según la primera hipótesis, parte de las moléculas producto P1^{RNasaIII} sufren un cambio conformacional que es reconocido y procesado para dar lugar al producto P2^{RNasaIII}. Según la segunda hipótesis, en algunas moléculas del RNA WNV 1-702 los dos cortes producidos por la Ec-RNasa III están ligados al mismo motivo estructural.

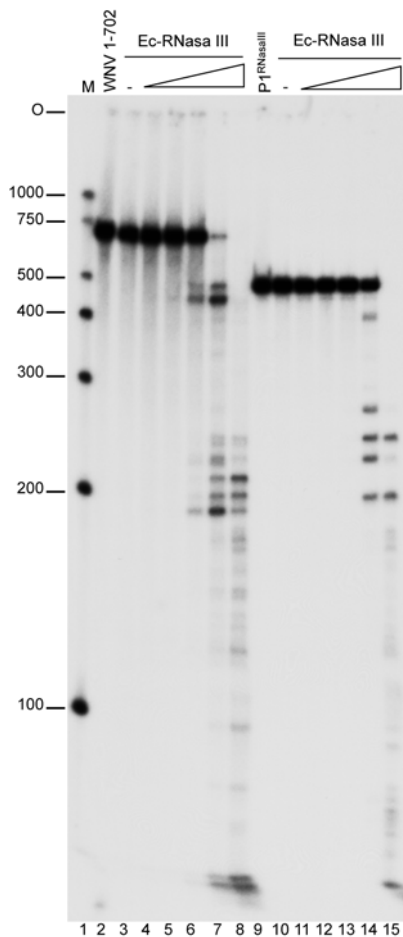


Fig. R.7.- Actividad de la Ec-RNasa III sobre el RNA WNV 1-702 y la banda producto P1^{RNasaIII}. Autoradiografía de un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 4% que muestra la actividad de la Ec-RNasa III sobre el RNA WNV 1-702^{α32P-GTP} y su banda producto P1^{RNasaIII}. Carril 1 (M), patrón de peso molecular de RNA en número de bases. Carriles 2 y 3, RNA WNV 1-702^{α32P-GTP} incubado en hielo y en tampón de reacción respectivamente. Carriles 4-8, RNA WNV 1-702^{α32P-GTP} incubado con concentraciones crecientes de Ec-RNasa III (0,00005, 0,0001, 0,0005, 0,001 y 0,005 U/μl consecutivamente). Carriles 10 y 11, P1^{RNasaIII} incubado en hielo y en tampón de reacción respectivamente. Carriles 12-15, P1^{RNasaIII} incubado con concentraciones crecientes de Ec-RNasa III (0,00005, 0,0001, 0,0005, 0,001 y 0,005 U/μl consecutivamente). O, indica el origen de la migración electroforética.

R.1.1.6.- Condiciones de corte primario y secundario

Todos los experimentos realizados hasta ahora con la Ec-RNasa III se han llevado a cabo bajo condiciones de corte secundario, es decir, a una concentración de iones monovalentes por debajo de 130 mM. Se quiso comprobar qué ocurría en el patrón de corte del RNA WNV 1-702 por la Ec-RNasa III cuando las condiciones se acercaban al modelo de corte primario. El corte primario se produce a altas concentraciones de iones monovalentes (150-300 mM) *in vitro* [Gross and Dunn, 1987], por lo que se prepararon nuevos tampones de reacción para la Ec-RNasa III con una concentración de 100, 130, 150 y 170 mM de acetato de amonio. Las reacciones se llevaron a cabo incubando el RNA WNV 1-702, marcado internamente con $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP}$ y a 0'6 nM final, con 0'0001 U/ μl de Ec-RNasa III y en tampón de reacción con concentraciones crecientes de iones monovalentes. El resultado de la figura R.8 muestra que el patrón de corte de la Ec-RNasa III en el RNA WNV 1-702 es idéntico tanto para bajas concentraciones (carril 7) como para altas concentraciones (carril 10) de acetato de amonio. Este resultado permite caracterizar bioquímicamente los cortes en el RNA WNV 1-702 como primarios.

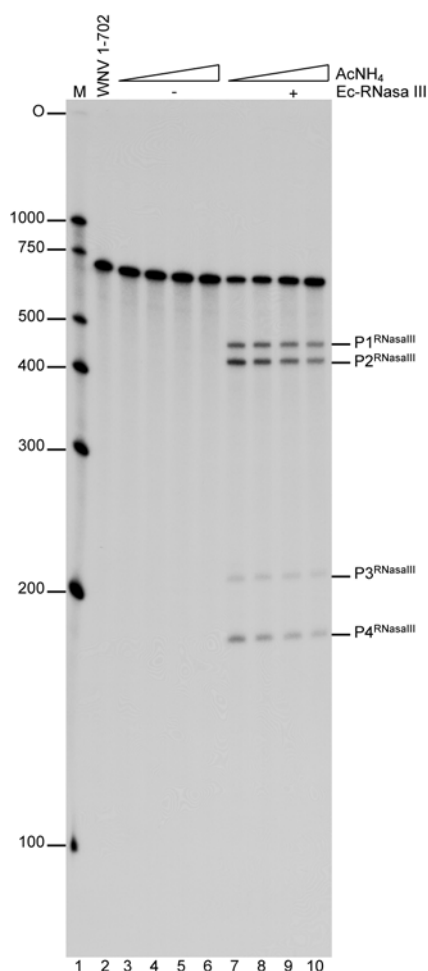


Fig. R.8.- Condiciones de corte primario y secundario.

Autoradiografía de un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 4% que muestra el patrón de corte de la Ec-RNasa III sobre el RNA WNV 1-702 $^{\alpha 32\text{P-GTP}}$ en condiciones de corte primario y secundario. Carril 1 (M), patrón de peso molecular de RNA en número de bases. Carril 2, RNA WNV 1-702 $^{\alpha 32\text{P-GTP}}$ incubado en hielo. Carriles 3-6, RNA WNV 1-702 $^{\alpha 32\text{P-GTP}}$ incubado en tampón de reacción con 100, 130, 150 y 170 mM de acetato de amonio consecutivamente. Carriles 7-10, RNA WNV 1-702 $^{\alpha 32\text{P-GTP}}$ incubado con 0'0001 U/ μl de Ec-RNasa III y con concentraciones crecientes de acetato de amonio (100, 130, 150 y 170 mM consecutivamente). O, indica el origen de la migración electroforética. Los productos de digestión P1 $^{\text{RNasall}}$ a P4 $^{\text{RNasall}}$ se indican en el margen del gel.

R.1.1.7.- Determinación de la posición del corte en la secuencia del RNA WNV 1-702

Para determinar el punto exacto del corte de la Ec-RNasa III en la secuencia del RNA WNV 1-702, se empleó la metodología que se detalla a continuación. Las bandas producto P3^{RNasaIII} y P4^{RNasaIII} fueron circularizadas con la enzima T4 RNA ligasa tal y como se hizo en el apartado R.1.1.3.2. Tras la circularización, se generó una hebra de cDNA mediante reacción de transcripción inversa (apartado M.2.13.4) con el oligo LC1-704-628as (5'-CTGGGCATTCATAAGTGATAG-3') y se realizó una PCR con los oligos LC1-704-628as y B3-4-LC1-704-down (5'-TCCAGAAGACATCGACTGTTG-3') para amplificar la región flanqueante a la zona de unión de los extremos 5' y 3'. Los productos de PCR fueron clonados en *E. coli* utilizando el plásmido pGEM[®]-T Easy (Promega) (apartado M.2.3) y secuenciados (apartado M.2.4 y M.2.6). Los datos obtenidos muestran dos posiciones de corte para la Ec-RNasa III en el RNA WNV 1-702: entre los nucleótidos C471 y C472 para dar lugar a la banda producto P3^{RNasaIII} y entre los nucleótidos G505 y U506 para dar lugar a la banda producto P4^{RNasaIII} (Fig. R.9).

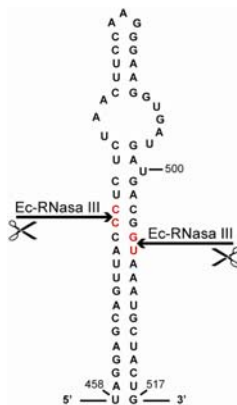
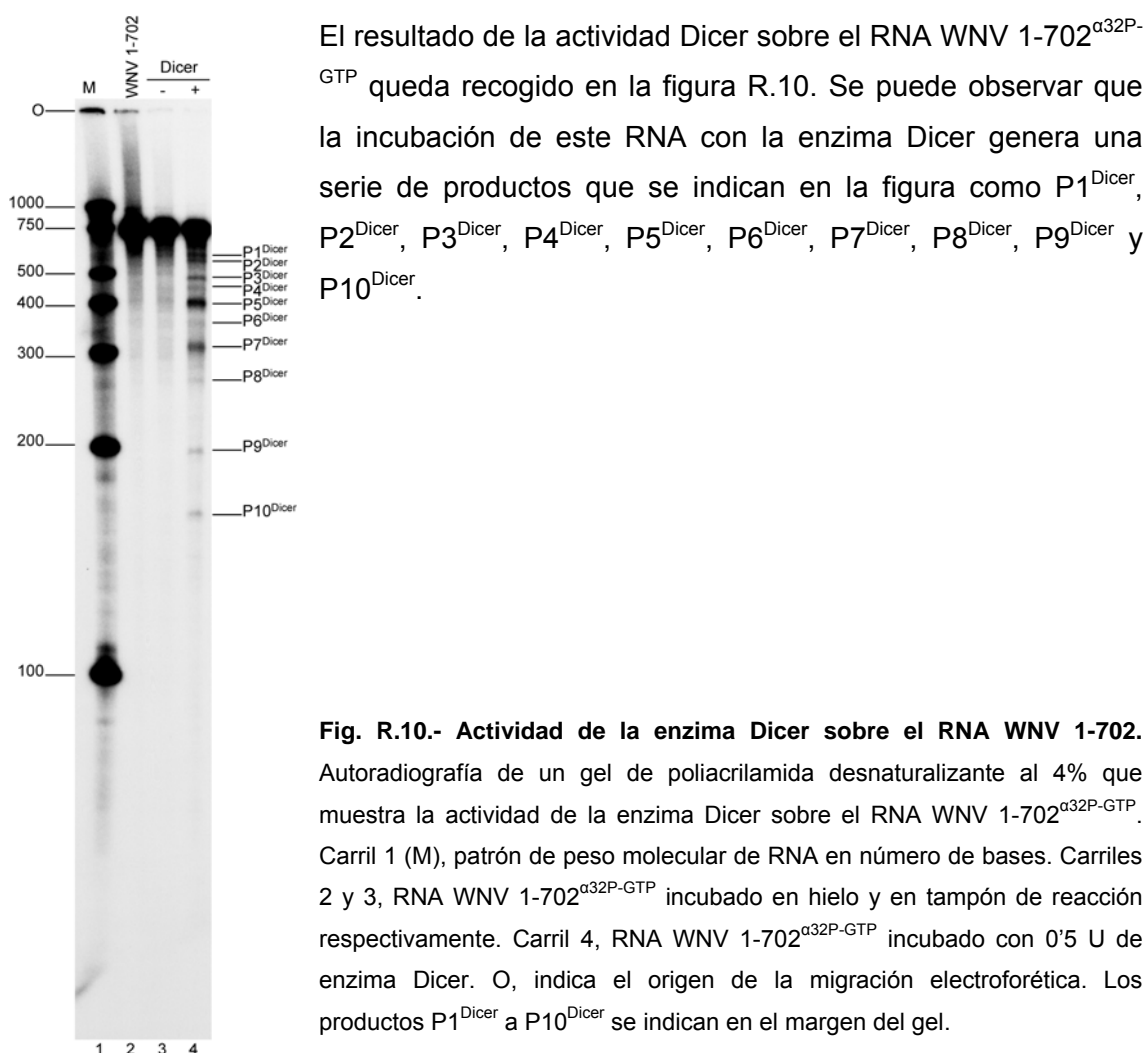


Fig. R.9.- Posiciones de corte de la Ec-RNasa III. En la figura se indican los cortes producidos por la Ec-RNasa III en la secuencia del RNA WNV 1-702. Se ha representado la estructura secundaria predicha por el programa *mfold* para la secuencia reconocida por la Ec-RNasa III. El enlace fosfodiéster donde se producen los cortes (entre los nucleótidos C471-C472 y G505-U506) se indica mediante flechas y los nucleótidos que forman parte del enlace se muestran en rojo.

R.1.2.- RNasa III EUCARIOTA DICER

R.1.2.1.- Ensayo de actividad sobre el RNA WNV 1-702

La actividad de la RNasa Dicer fue probada sobre el fragmento de RNA que contiene los primeros 702 nucleótidos del genoma del WNV (RNA WNV 1-702) *in vitro*. Para ello, el RNA WNV 1-702 marcado con [α - 32 P]-GTP a lo largo de toda la cadena (RNA WNV 1-702 $^{\alpha 32P}$ -GTP) fue incubado con la enzima Dicer (Genlantis) en las condiciones de reacción que se detallan en el apartado M.2.12.2. La concentración de RNA sustrato WNV 1-702 utilizada fue de 0'6 nM final y la concentración de Dicer, elegida tras calibrar la enzima en un rango que iba de 0'1 a 3U, fue de 0'5U.



R.1.2.2.- Caracterización de la especificidad de corte

Con el fin de garantizar que los productos observados tras la incubación del RNA WNV 1-702 con Dicer son producidos por esta RNasa y descartar que se deban a alguna actividad no deseada de la enzima recombinante o a una contaminación en el extracto comercial, se llevaron a cabo las dos estrategias empleadas también en el estudio realizado con la RNasa III de *E. coli*. En una de ellas se realizó un ensayo de competición enzimática con un sustrato específico para Dicer. Y, en la otra, se quiso comprobar la naturaleza química de los nuevos extremos generados tras el corte y que son característicos de Dicer.

R.1.2.2.1.- Competiciones enzimáticas

Dicer es una endoribonucleasa específica de RNA doble cadena (dsRNA). Como se describe en la introducción, Dicer procesa dsRNA largos y pre-miRNAs en fragmentos de dsRNA cortos (siRNAs y miRNAs) de unos ~21-25 nucleótidos de longitud [Bernstein *et al.*, 2001]. Por ello, para competir el corte de la enzima Dicer en el RNA WNV 1-702, se utilizó un pre-miRNA.

Como pre-miRNA se eligió el precursor del miR-122, un RNA de unos 66 nucleótidos de longitud cuya secuencia se tomó de [Chang *et al.*, 2003] y el molde de DNA se diseñó según [Leuschner and Martinez, 2007]. Para comprobar que este pre-miRNA era reconocido y procesado por la enzima Dicer *in vitro*, 150 cpm del pre-miR-122 marcado internamente con $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ (pre-miR-122 ^{$\alpha^{32}\text{P-ATP}$}) fueron incubadas con la enzima Dicer como se detalla en el apartado M.2.12.2. Como se muestra en la figura R.11.A, el pre-miR-122 es reconocido y procesado por la enzima Dicer *in vitro* apareciendo unas bandas, mayoritariamente en torno a 25 nucleótidos de longitud, propias de los miRNAs y que se señalan en la figura con una flecha.

El pre-miR-122 fue utilizado como competidor del corte del RNA WNV 1-702 en una relación molar. El RNA WNV 1-702, marcado internamente con $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP}$ y a una concentración constante de 0'6 nM final, fue incubado con 0'5 U de la enzima Dicer y con concentraciones crecientes del pre-miR-122 (6, 60, 160, y 320 nM) también marcado internamente. La inspección visual del resultado, que se muestra en la figura R.11.B, revela que sólo la aparición de las bandas producto P3^{Dicer} y P9^{Dicer} se ven afectadas por el competidor y que, por tanto, dichos productos son los únicos

específicos de la actividad Dicer. Los productos P3^{Dicer} (~500 nts) y P9^{Dicer} (~200 nts) parecen sumar la longitud completa del RNA WNV 1-702, sugiriendo que proceden de un mismo corte. Este trabajo se ha centrado en la caracterización de la banda producto P9^{Dicer}. Dicho producto se redujo a la mitad cuando el RNA WNV 1-702^{α32P-GTP} fue incubado con una concentración de competidor 100 veces mayor, es decir, con 60 nM de pre-miR-122 (carril 6).

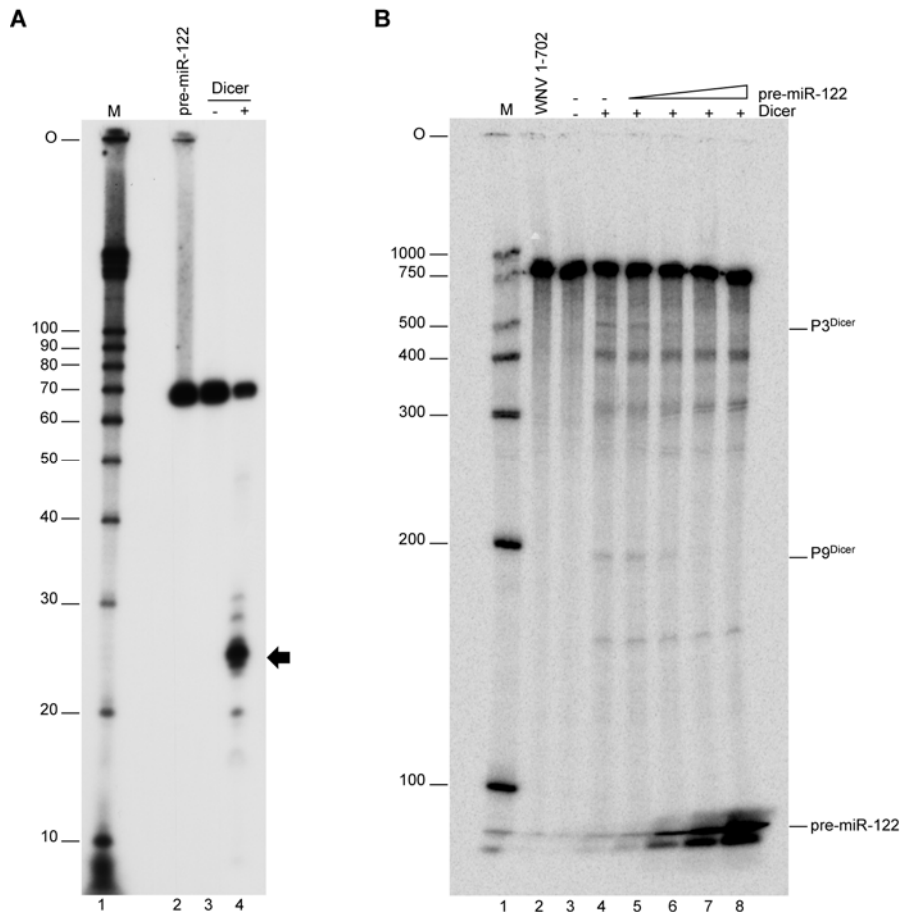


Fig. R.11.- Competición con el pre-miR-122. (A) Autoradiografía de un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 10% en el que se muestra la actividad de la enzima Dicer sobre el pre-miR-122^{α32P-ATP}. Carril 1 (M), patrón de peso molecular de RNA en número de bases. Carriles 2 y 3, pre-miR-122^{α32P-ATP} incubado en hielo y en tampón de reacción respectivamente. Carril 4, pre-miR-122^{α32P-ATP} incubado en presencia de 0'5U de enzima Dicer. El producto mayoritario propio de los miRNAs se indica con una flecha. (B) Autoradiografía de un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 4% que muestra la competición del corte del RNA WNV 1-702^{α32P-GTP} por el pre-miR-122^{α32P-GTP}. Carril 1 (M), patrón de peso molecular de RNA en número de bases. Carriles 2 y 3, RNA WNV 1-702^{α32P-GTP} incubado en hielo y en tampón de reacción respectivamente. Carril 4, patrón de corte del RNA WNV 1-702^{α32P-GTP} con 0'5 U de enzima Dicer. Carriles 5-8, reacciones de competición en las que el RNA WNV 1-702^{α32P-GTP} a 0'6 nM final fue incubado con 0'5U de Dicer y concentraciones crecientes del pre-miR-122^{α32P-GTP} (6, 60, 160 y 320nM consecutivamente). La migración electroforética del pre-miR-122 y de los productos de digestión P3^{Dicer} y P9^{Dicer} se indica al margen del gel. O, indica el origen de la migración electroforética en ambos gels.

R.1.2.2.2.- Determinación de los grupos químicos de los nuevos extremos generados tras el corte

La enzima Dicer es un miembro de la familia RNasa III y, como tal, tras el corte los nuevos extremos generados en el RNA son 5'-fosfato y 3'-hidroxilo [MacRae *et al.*, 2007]. La digestión con la enzima Dicer de aproximadamente 250 cpm del RNA WNV 1-702 marcado internamente con $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP}$ (RNA WNV 1-702 $^{\alpha 32\text{P-GTP}}$), en su extremo 5' con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP}$ (RNA WNV 1-702 $^{\gamma 32\text{P-GTP}}$) y en su extremo 3' con $[5'\text{-}^{32}\text{P}]\text{-pCp}$ (RNA WNV 1-702 $^{32\text{P-pCp}}$) mostró que el producto de digestión P9^{Dicer} conserva el extremo 3' del RNA WNV 1-702 (Fig. R.12).

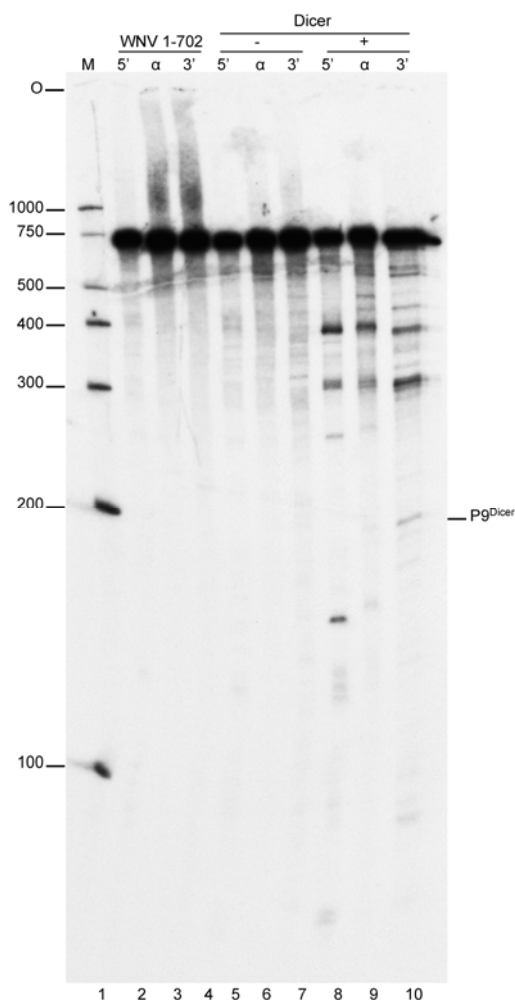


Fig. R.12.- Localización de los productos de corte en relación a los extremos 5' y 3' del RNA WNV 1-702. Autorradiografía de un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 4% que muestra el patrón de corte de la enzima Dicer en el RNA WNV 1-702 $^{\gamma 32\text{P-GTP}}$, WNV 1-702 $^{\alpha 32\text{P-GTP}}$ y WNV 1-702 $^{32\text{P-pCp}}$. Carril 1 (M), patrón de peso molecular de RNA en número de bases. Carriles 2, 5 y 8: muestran el RNA WNV 1-702 $^{\gamma 32\text{P-GTP}}$ incubado en hielo, en tampón de reacción y con 0'5 U de enzima Dicer respectivamente. Carriles 3, 6 y 9: muestran el RNA WNV 1-702 $^{\alpha 32\text{P-GTP}}$ incubado en hielo, en tampón de reacción y con 0'5 U de enzima Dicer respectivamente. Carriles 4, 7 y 10: muestran el RNA WNV 1-702 $^{32\text{P-pCp}}$ incubado en hielo, en tampón de reacción y con 0'5 U de enzima Dicer respectivamente. O, indica el origen de la migración electroforética. El producto de digestión P9^{Dicer} se indica en el margen del gel.

La identificación del grupo químico presente en el extremo 5' de P9^{Dicer} se realizó utilizando la enzima T4 RNA ligasa. Esta enzima puede circularizar fragmentos de RNA con extremos 5'-fosfato y 3'-hidroxilo [Silber *et al.*, 1972]. La cantidad necesaria de banda producto P9^{Dicer} se obtuvo escalando diez veces una reacción de corte estándar del RNA WNV 1-702 con Dicer, los productos de reacción se resolvieron mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida desnaturante y la banda producto P9^{Dicer} fue purificada del gel de poliacrilamida según el apartado M.2.10.2. La cantidad del producto recuperado tras la elución de la banda se dividió en dos partes, una de las cuales fue tratada con la enzima T4 RNA ligasa tal y como se detalla en el apartado M.2.13.2, y la otra mitad fue utilizada como control sin tratar con la enzima. El resultado de este estudio se muestra en la figura R.13 y se puede observar que la banda producto P9^{Dicer} incubada con la enzima T4 RNA ligasa (carril 3) presenta una migración electroforética más lenta que el control sin tratar con la enzima. Esta movilidad es característica de una conformación circular del RNA producida por una ligación de sus extremos que deben de ser, por tanto, 5'-fosfato y 3'-hidroxilo.

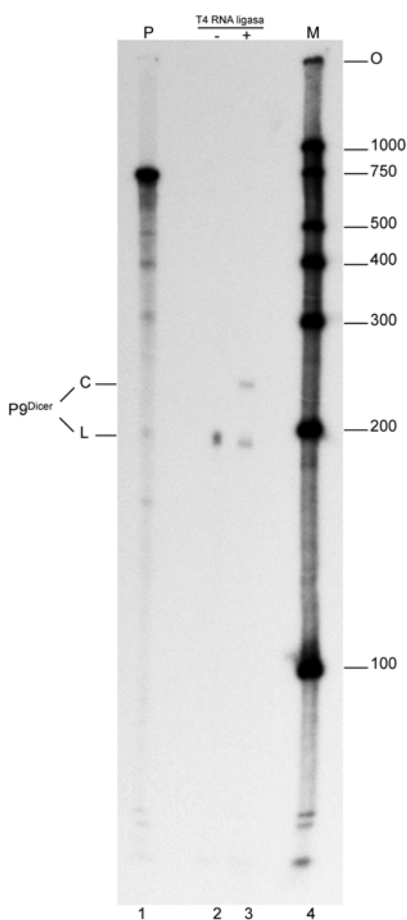


Fig. R.13.- Caracterización enzimática del nuevo extremo generado en la banda producto P9^{Dicer}. Autoradiografía de un gel de poliacrilamida desnaturante al 4% que muestra la caracterización del extremo 5' de la banda producto P9^{Dicer}. Carril 1 (P), patrón de corte de la enzima Dicer sobre el RNA WNV 1-702^{α32P-GTP}. Carriles 2 y 3, P9^{Dicer} incubada en tampón de reacción (carril 2) y con T4 RNA ligasa (carril 3). Carril 4 (M), patrón de peso molecular de RNA en número de bases. La migración electroforética de la conformación circular (C) y lineal (L) de la banda producto P9^{Dicer} se indica al margen del gel. O, indica el origen de la migración electroforética.

R.1.2.3.- Determinación de la posición del corte en la secuencia del RNA WNV 1-702

La determinación del punto exacto del corte de la RNasa Dicer en la secuencia del RNA WNV 1-702 se llevó a cabo utilizando dos metodologías diferentes. Una de ellas fue el método del clonaje, descrito en el apartado R.1.1.7 para el caso de la Ec-RNasa III, en el que la banda producto P9^{Dicer} se circularizó, clonó y secuenció utilizando los mismos oligos que en dicho apartado. La otra metodología empleada fue la *5' Rapid Amplification of cDNA Ends* (5' RACE). Esta metodología se emplea para amplificar la secuencia desconocida en el extremo 5' de un RNA del que sí que se conoce su secuencia 3'. La descripción detallada de esta metodología se puede consultar en el apartado M.2.13.5. Este protocolo se llevó a cabo con la banda producto P9^{Dicer} y utilizando el oligo LC1-704-628as tanto para la síntesis de la hebra de cDNA como para la posterior PCR junto con el oligo PSTdTDOWN (5'-CTGCAG(T)₁₈-3'). Para ambas metodologías empleadas, los datos de secuenciación obtenidos muestran que el punto de corte de la enzima Dicer en el RNA WNV 1-702 se encuentra entre los nucleótidos G505 y U506 (Fig. R.14).

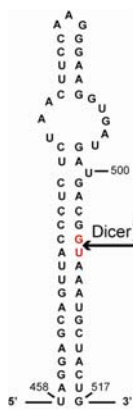


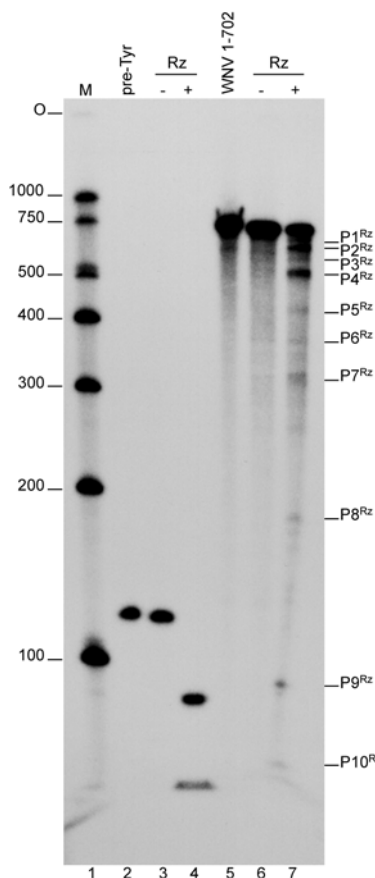
Fig. R.14.- Posición de corte para Dicer. En la figura se indica el corte producido por Dicer en la secuencia del RNA WNV 1-702. Se ha representado la estructura secundaria predicha por el programa *mfold* para la secuencia reconocida por Dicer. El enlace fosfodiéster donde se produce el corte (entre los nucleótidos G505-U506) se indica con una flecha y los nucleótidos que forman parte del enlace se muestran en rojo.

R.2.- RNasa P

R.2.1.- SUBUNIDAD RNA DE LA RNasa P DE *Synechocystis* sp. PPC 6803

R.2.1.1.- Ensayo de actividad sobre el RNA WNV 1-702

Se ensayó la actividad de la subunidad de RNA de la RNasa P de la cianobacteria *Synechocystis* sp. PPC 6803 (denominada a partir de ahora Rz6803) en los primeros 702 nucleótidos del genoma del WNV (RNA WNV 1-702). El RNA WNV 1-702, marcado a lo largo de toda la cadena con [α - 32 P]-GTP y a una concentración final de 1'8 nM, fue incubado con el Rz6803 (apartado M.1.4.2.1) a una concentración final de 67'5 nM (concentración elegida tras calibrar el Rz6803 con este sustrato) en las condiciones de reacción que se detallan en el apartado M.2.12.3. Como control positivo de la reacción de corte se utilizó el precursor del tRNA de la tirosina (pre-Tyr). Este RNA pre-Tyr (apartado M.1.4.2.2) fue también marcado radiactivamente a lo largo de toda la cadena y fue incubado con el Rz6803 en las mismas condiciones de



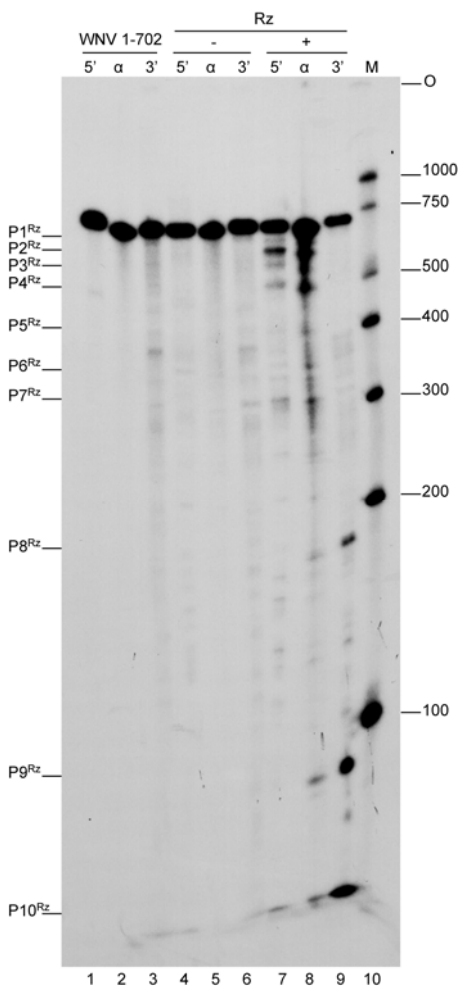
reacción. El resultado obtenido se muestra en la figura R.15. La incubación del Rz6803 con el RNA WNV 1-702 produjo una serie de bandas producto (carril 7) de las cuales se indican en la figura las que se seleccionaron para continuar este estudio: P1^{Rz}, P2^{Rz}, P3^{Rz}, P4^{Rz}, P5^{Rz}, P6^{Rz}, P7^{Rz}, P8^{Rz}, P9^{Rz} y P10^{Rz}.

Fig. R.15.- Actividad del Rz6803 sobre el RNA WNV 1-702.

Autoradiografía de un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 4% que muestra la actividad del Rz6803 sobre el RNA WNV 1-702^{α32P-GTP}. Carril 1 (M), patrón de peso molecular de RNA en número de bases. Carriles 2, 3 y 4; RNA pre-Tyr^{α32P-GTP} incubado en hielo, en tampón de reacción, y con el Rz6803 respectivamente. Carriles 5, 6 y 7; RNA WNV 1-702^{α32P-GTP} incubado en hielo, en tampón de reacción y en presencia del Rz6803 respectivamente. O, indica el origen de la migración electroforética. Los productos de digestión P1^{Rz} a P10^{Rz} se indican en el margen del gel.

R.2.1.2.- Localización de los productos de corte en relación a los extremos 5' y 3' del RNA WNV 1-702

Para localizar la posición de los productos de corte en relación a los extremos del RNA WNV 1-702, se identificó qué productos conservan el extremo 5' y 3' del RNA tras el corte por el Rz6803. Para ello se procedió a marcar el RNA en su extremo 5' con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP}$ (RNA WNV 1-702 ^{γ 32P-GTP}), a lo largo de toda su cadena con $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP}$ (RNA WNV 1-702 ^{α 32P-GTP}), y en su extremo 3' con $[\text{5}'\text{-}^{32}\text{P}]\text{-pCp}$ (RNA WNV 1-702^{32P-pCp}). Los marcajes del RNA se realizaron como se describe en el apartado M.2.8. El RNA WNV 1-702 ^{α 32P-GTP} a una concentración final de 1'8 nM y aproximadamente 333 cpm de los RNAs WNV 1-702 ^{γ 32P-GTP} y WNV 1-702^{32P-pCp} fueron incubados con el Rz6803 en las condiciones de reacción estándar que se especifican en el apartado M.2.12.3.



Como muestra el resultado de la figura R.16, la digestión del RNA WNV 1-702 ^{α 32P-GTP} con el Rz6803 dio lugar a las bandas producto P1^{Rz} a P10^{Rz}; la digestión del RNA WNV 1-702 ^{γ 32P-GTP} con el Rz6803 dio lugar a las bandas P1^{Rz} a P7^{Rz}; y la digestión del RNA WNV 1-702^{32P-pCp} con el Rz6803 dio lugar a las bandas P8^{Rz}, P9^{Rz} y P10^{Rz}. Estos resultados indican que las bandas producto P1^{Rz} a P7^{Rz} conservan el extremo 5' del RNA WNV 1-702, mientras que las bandas producto P8^{Rz}, P9^{Rz} y P10^{Rz} conservan el extremo 3' del RNA WNV 1-702.

Fig. R.16.- Localización de los productos de corte en relación a los extremos 5' y 3' del RNA WNV 1-702. Autoradiografía de un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 4% que muestra el patrón de corte del Rz6803 en el RNA WNV 1-702 ^{γ 32P-GTP}, WNV 1-702 ^{α 32P-GTP} y WNV 1-702^{32P-pCp}. Carriles 1, 4 y 7: muestran el RNA WNV 1-702 ^{γ 32P-GTP} incubado en hielo, en tampón de reacción y con el Rz6803 respectivamente. Carriles 2, 5 y 8: muestran el RNA WNV 1-702 ^{α 32P-GTP} incubado en hielo, en tampón de reacción y con el Rz6803 respectivamente. Carriles 3, 6 y 9: muestran el RNA WNV 1-702^{32P-pCp} incubado en hielo, en tampón de reacción y con el Rz6803 respectivamente. Carril 10 (M), patrón de peso molecular de RNA en número de bases. O, indica el origen de la migración electroforética. Los productos de digestión P1^{Rz} a P10^{Rz} se indican en el margen del gel.

R.2.1.3.- Caracterización de la especificidad de corte

El estudio de especificidad del corte para garantizar que los productos de digestión observados tras la incubación del RNA WNV 1-702 con el Rz6803 son producidos por dicho ribozima se llevó a cabo utilizando dos estrategias. Como se comentó en la Introducción, el Rz6803 necesita tanto iones divalentes como monovalentes para el corte *in vitro*, por este motivo se comprobó la dependencia de iones potasio y magnesio en la reacción. También se determinó la naturaleza química de los nuevos extremos generados en el RNA tras el corte.

R.2.1.3.1- Dependencia de iones

R.2.1.3.1.1.- Dependencia de iones magnesio

La dependencia de iones divalentes en el procesamiento del RNA WNV 1-702 por el Rz6803 se comprobó eliminando el magnesio de la reacción. Una reacción estándar del RNA WNV 1-702 con el Rz6803 (apartado M.2.12.3) fue utilizada como patrón control del corte. Otra reacción fue realizada en ausencia de magnesio. Para eliminar el magnesio, tanto el Rz6803 como el RNA WNV 1-702 fueron preincubados con EDTA pH 7.5 2 mM y Tris-HCl pH 7.5 50 mM durante 2 horas o toda la noche a 37°C, y el tampón que se utilizó en la reacción se preparó también sin magnesio. Una réplica de la reacción en ausencia de magnesio fue suplementada a posteriori con la cantidad de magnesio necesaria para igualar la de la reacción estándar.

El resultado de este estudio se muestra en la figura R.17. La aparición de los productos de corte es dependiente de magnesio ya que cuando se elimina el magnesio en la reacción no se produce ningún patrón de corte en el RNA WNV 1-702 (carriles 6 y 11); sin embargo, cuando esta misma reacción es suplementada con magnesio (carriles 8 y 13) se recupera el patrón de corte característico (carril 3).

R.2.1.3.1.2.- Dependencia de potasio

La dependencia de iones monovalentes en el procesamiento del RNA WNV 1-702 por el Rz6803 se comprobó disminuyendo la concentración de KCl utilizada en la

reacción. El rango de concentraciones de KCl que se utilizó fue de 1 M hasta 0'005 M final. Se realizó una reacción estándar (apartado M.2.12.3) en la que el RNA WNV 1-702 marcado con $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP}$ (RNA WNV 1-702 $^{\alpha 32\text{P-GTP}}$) se incubó con el Rz6803 pero con las diferentes concentraciones de KCl.

El resultado obtenido para este estudio se recoge en la figura R.18. Se puede observar que al disminuir la concentración de KCl disminuye la eficiencia de corte producido por el Rz6803 (carriles 8-13).

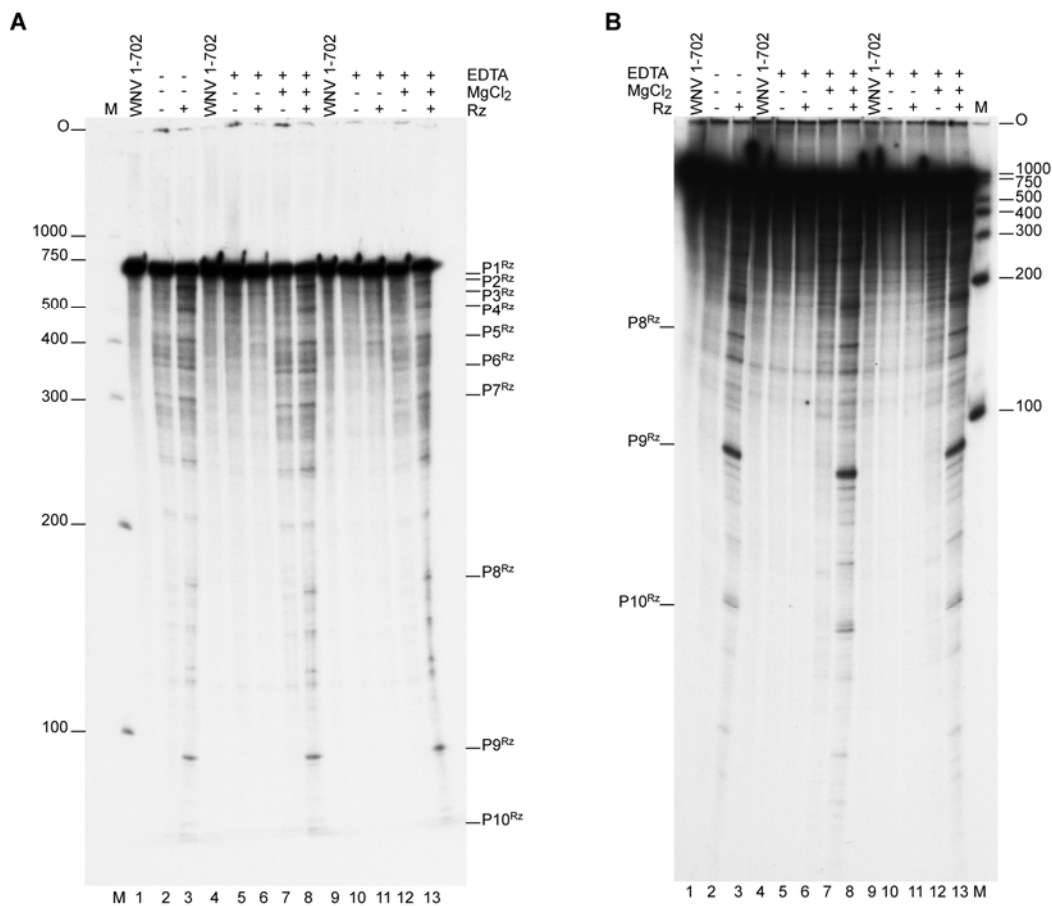


Fig. R.17.- Dependencia de iones magnesio. Autorradiografía de un gel de poliácridamida desnaturalizante al 4% (**A**) y al 10% (**B**), que muestra la dependencia de magnesio para el corte del Rz6803. Los carriles 1, 2 y 3 muestran las incubaciones estándar del RNA WNV 1-702 $^{\alpha 32\text{P-GTP}}$ en hielo, en tampón de reacción y en presencia del Rz6803 respectivamente. Para el resto de carriles se utilizó un tampón de reacción sin magnesio utilizando tanto el RNA WNV 1-702 $^{\alpha 32\text{P-GTP}}$ como el Rz6803 preincubados con EDTA 2 mM durante 2 horas (carriles 4-8) o toda la noche (carriles 9-13). El RNA WNV 1-702 $^{\alpha 32\text{P-GTP}}$ fue incubado en hielo (carriles 4 y 9), en tampón de reacción (5 y 10) y en presencia del Rz6803 (carriles 6 y 11). Las incubaciones en tampón de reacción y en presencia del Rz6803 fueron suplementadas con magnesio en los carriles 7, 8, 12 y 13. M, patrón de peso molecular de RNA en número de bases. O, indica el origen de la migración electroforética en ambos geles. La migración electroforética correspondiente a los productos de digestión P1^{Rz} - P10^{Rz} se indican en el margen de cada gel.

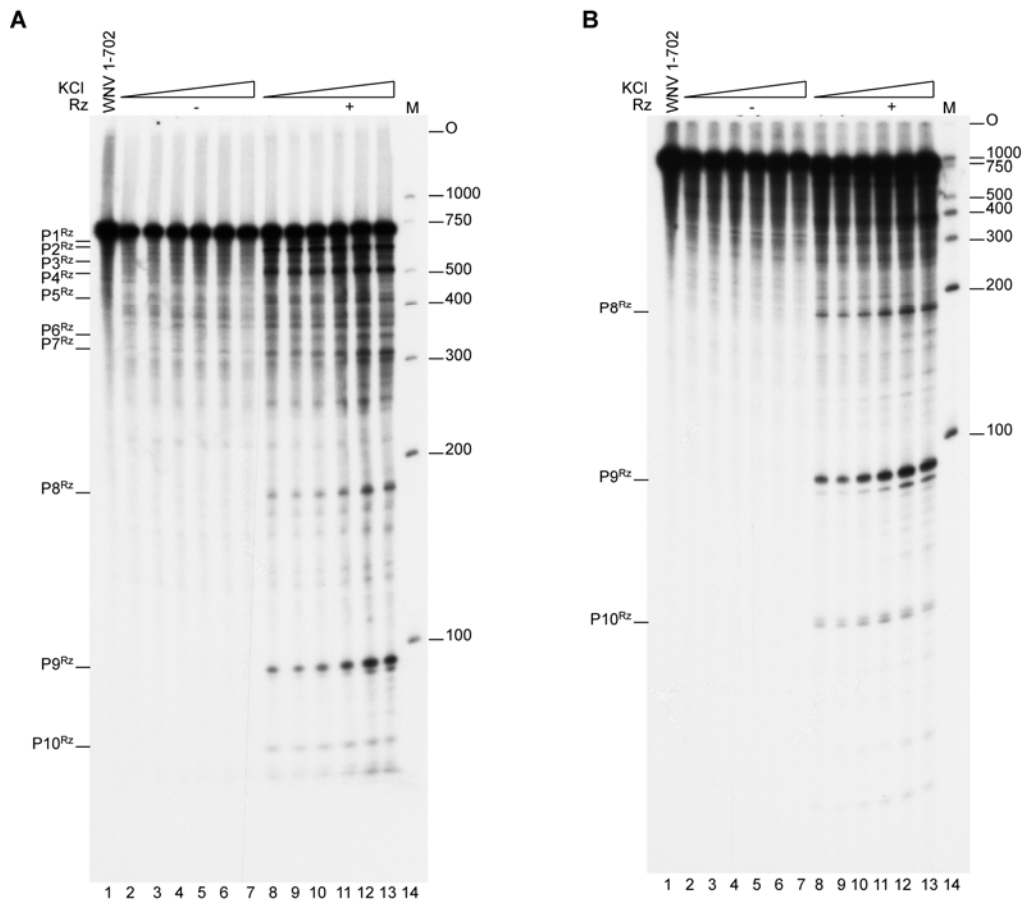


Fig. R.18.- Dependencia de iones potasio. Autorradiografía de un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 4% **(A)** y al 10% **(B)**, que muestra la dependencia de potasio para el corte del Rz6803. Carril 1, RNA WNV 1-702^{α32P-GTP} incubado en hielo. Carriles 2-7, RNA WNV 1-702^{α32P-GTP} incubado en tampón de reacción con 0'005, 0'01, 0'05, 0'1, 0'5 y 1M de KCl consecutivamente. Carriles 8-13, RNA WNV 1-702^{α32P-GTP} incubado con el Rz6803 y 0'005, 0'01, 0'05, 0'1, 0'5 y 1M de KCl consecutivamente. Carril 14 (M), patrón de peso molecular de RNA en número de bases. O, indica el origen de la migración electroforética en ambos geles. La migración electroforética correspondiente a los productos de digestión P1^{Rz} - P10^{Rz} se indican en el margen de cada gel.

R.2.1.3.2- Determinación de los grupos químicos de los nuevos extremos generados tras el corte

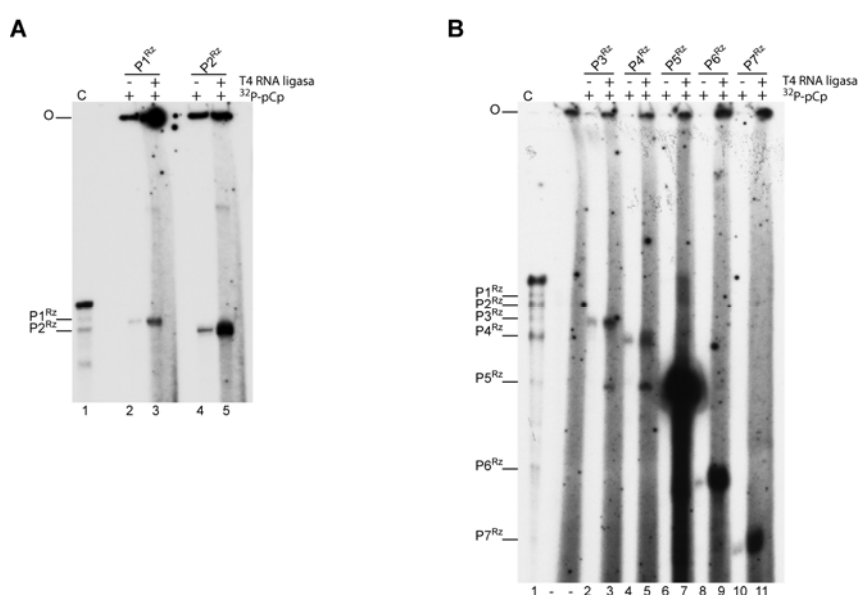
Los nuevos extremos generados en un RNA tras ser procesado por el Rz6803 son 5'-fosfato y 3'-hidroxilo. Las enzimas T4 RNA ligasa y T4 polinucleótido quinasa (T4 PNK) fueron utilizadas para comprobar que los nuevos extremos generados tras el corte del RNA WNV 1-702 por el Rz6803 tenían dichos grupos químicos. Estas enzimas reconocen específicamente los extremos del RNA (consultar sección de resultados R.1.1.3.2).

Los resultados obtenidos en el apartado R.2.1.2 muestran que las bandas producto P1^{Rz} a P7^{Rz} conservan el extremo 5' del RNA WNV 1-702, mientras que las bandas producto P8^{Rz}, P9^{Rz} y P10^{Rz} conservan el extremo 3'. Teniendo ésto en cuenta, la enzima T4 polinucleótido quinasa fue utilizada para caracterizar los grupos químicos del nuevo extremo 5' de las bandas producto P8^{Rz}, P9^{Rz} y P10^{Rz} por adición de [γ -³²P]-ATP. La enzima T4 RNA ligasa fue utilizada para caracterizar los grupos químicos del nuevo extremo 3' de las bandas producto P1^{Rz} a P7^{Rz} mediante la adición de [5'-³²P]-pCp; y del nuevo extremo 5' de las bandas producto P8^{Rz}, P9^{Rz} y P10^{Rz} mediante su circularización.

La cantidad necesaria de cada banda producto para la realización de este estudio enzimático se obtuvo escalando diez veces una reacción de corte estándar (apartado M.2.12.3) en la que el RNA WNV 1-702 marcado a lo largo de toda su cadena con [α -³²P]-GTP fue incubado con el Rz6803, los productos de reacción se resolvieron mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 4%, y las bandas producto fueron purificadas del gel de poliacrilamida (apartado M.2.10.2).

► Las bandas producto P1^{Rz} a P7^{Rz} fueron incubadas con la enzima T4 RNA ligasa (Promega) y [5'-³²P]-pCp como se detalla en el apartado M.2.8.3. Como control se utilizó la misma cantidad de producto y las mismas condiciones de reacción pero sin incubar con la enzima. El resultado de este experimento se muestra en las figuras R.19.A y R.19.B. Se puede observar que se produce la intensificación de cada una de las bandas producto que han sido tratadas con la enzima (carriles 3 y 5 de la Fig. R.19.A y carriles 3, 5, 7, 9 y 11 de la Fig. R.19.B) con respecto al control sin tratar. Esto indica que se ha producido la adición de [5'-³²P]-pCp al extremo 3' de la banda producto y que, por tanto, el nuevo extremo generado tras el corte contiene un extremo 3'-hidroxilo para las bandas P1^{Rz} a P7^{Rz}.

► Las bandas producto P8^{Rz}, P9^{Rz} y P10^{Rz} fueron desfosforiladas con fosfatasa alcalina de gamba (USB) y, posteriormente, tratadas con la enzima T4 polinucleótido quinasa (NEB) y [γ -³²P]-ATP (apartado M.2.13.3). Como control se utilizó la misma cantidad de producto y las mismas condiciones de reacción pero sin una desfosforilación previa. El resultado (Fig. R.19.C) muestra la intensificación de las bandas producto P8^{Rz}, P9^{Rz} y P10^{Rz} que han sido desfosforiladas previamente (carriles 3, 5 y 7). Este resultado indica que se ha producido la incorporación de un grupo ³²PO₄ desde la posición γ del ATP al extremo 5' de la banda producto y, por tanto, que el nuevo extremo generado tras el corte para las bandas producto P8^{Rz}, P9^{Rz} y P10^{Rz} contiene un extremo 5'-fosfato. También se comprobó dicho extremo utilizando la enzima T4 RNA ligasa (Promega). La T4 RNA ligasa produce la circularización de fragmentos de RNA con extremos 5'-fosfato y 3'-hidroxilo. Tras incubar las bandas producto P8^{Rz}, P9^{Rz} y P10^{Rz} con dicha enzima según las condiciones de reacción que se especifican en el apartado M.2.13.2, el resultado (Fig. R.19.D) muestra una migración electroforética más lenta, propia de una conformación circular en el RNA, para la banda producto P8^{Rz} (carril 2). En la banda producto P9^{Rz} se produce un ligero cambio en la movilidad electroforética (carril 4) aunque no se ha podido determinar si corresponde a una conformación circular. Para la banda producto P10^{Rz} no se aprecia ningún cambio en la migración (carril 6). Esto puede ser debido a que el tamaño del producto de reacción P10^{Rz}, menor de 100 nucleótidos, imposibilite la ligación de los extremos del RNA probablemente por cuestiones geométricas.



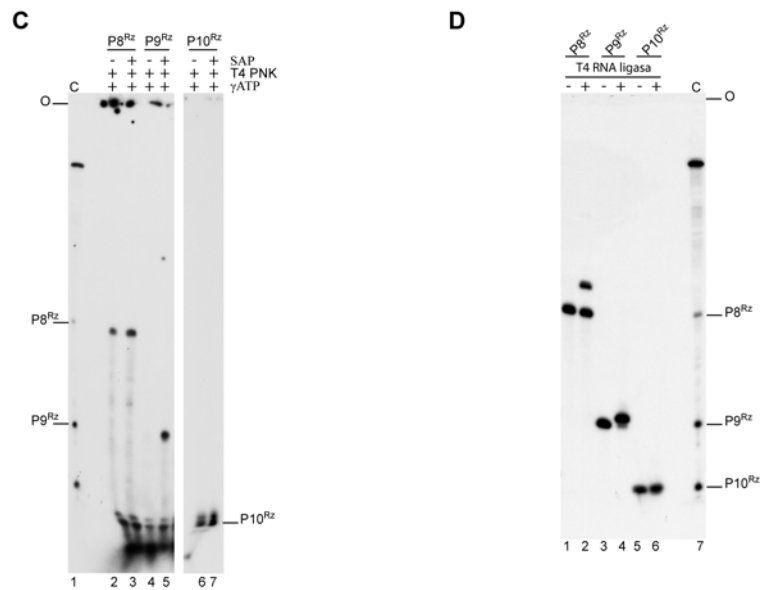


Fig. R.19.- Caracterización enzimática de los nuevos extremos generados tras el corte del RNA WNV 1-702 por el Rz6803. Las bandas producto P1^{Rz} a P10^{Rz} fueron sometidas a diferentes reacciones enzimáticas para determinar los grupos químicos de los extremos. **(A, B)** Extremo 3'. **(A)** Carril 1 (C), patrón de bandas producto. Carriles 2 y 4; muestran respectivamente las bandas P1^{Rz} y P2^{Rz}, que han sido incubadas con [5'-³²P]-pCp sin T4 RNA ligasa. Carriles 3 y 5; muestran respectivamente las bandas P1^{Rz} y P2^{Rz}, que han sido incubadas con [5'-³²P]-pCp y T4 RNA ligasa. **(B)** Carril 1 (C), patrón de bandas producto. Carriles 2, 4, 6, 8 y 10; muestran respectivamente las bandas P3^{Rz}, P4^{Rz}, P5^{Rz}, P6^{Rz} y P7^{Rz} que han sido incubadas con [5'-³²P]-pCp sin T4 RNA ligasa. Carriles 3, 5, 7, 9 y 11; muestran respectivamente las bandas P3^{Rz}, P4^{Rz}, P5^{Rz}, P6^{Rz} y P7^{Rz} que han sido incubadas con [5'-³²P]-pCp y T4 RNA ligasa. **(C)** Extremo 5'. Carril 1 (C), patrón de bandas producto. Carriles 2, 4 y 6; muestran respectivamente las bandas P8^{Rz}, P9^{Rz} y P10^{Rz} que han sido incubadas con T4 polinucleótido quinasa y [γ-³²P]-ATP, sin tratamiento previo con fosfatasa. Carriles 3, 5 y 7; muestran respectivamente las bandas P8^{Rz}, P9^{Rz} y P10^{Rz} que han sido incubadas con T4 polinucleótido quinasa y [γ-³²P]-ATP previo tratamiento con fosfatasa. **(D)** Extremos 5' y 3'. Carriles 1, 3 y 5; muestran respectivamente las bandas P8^{Rz}, P9^{Rz} y P10^{Rz} incubadas en tampón de reacción. Carriles 2, 4 y 6; muestran respectivamente las bandas P8^{Rz}, P9^{Rz} y P10^{Rz} incubadas con T4 RNA ligasa. Carril 7 (C), patrón de bandas producto. O, indica el origen de la migración electroforética en todos los geles. En el margen de cada gel se indica la migración electroforética según el patrón de bandas producto para P1^{Rz} - P10^{Rz}.

R.2.1.4.- Determinación de la posición del corte en la secuencia del RNA WNV 1-702

Los cortes producidos por el Rz6803 en los primeros 702 nucleótidos del genoma del WNV son varios. La determinación de los puntos de corte en la secuencia del RNA WNV 1-702 que dan lugar a las bandas producto P8^{Rz}, P9^{Rz} y P10^{Rz} se llevó a cabo utilizando dos metodologías diferentes. Mediante una metodología de secuenciación directa del RNA (Fig. R.20.A) se ha determinado un corte entre los nucleótidos A610 y U611 (correspondiente al corte que produce la banda producto P9^{Rz}) y otro entre los nucleótidos U645 y G646 (correspondiente al corte que produce la banda producto P10^{Rz}). Mediante el método del clonaje, utilizando la misma metodología y oligos del apartado R.1.1.7, para la banda producto P8^{Rz} se obtuvieron dos posibles puntos de corte: entre los nucleótidos G517-A518 y entre los nucleótidos U521-C522. En la figura R.20.B se indican las posiciones de corte del Rz6803 en la secuencia del RNA WNV 1-702.

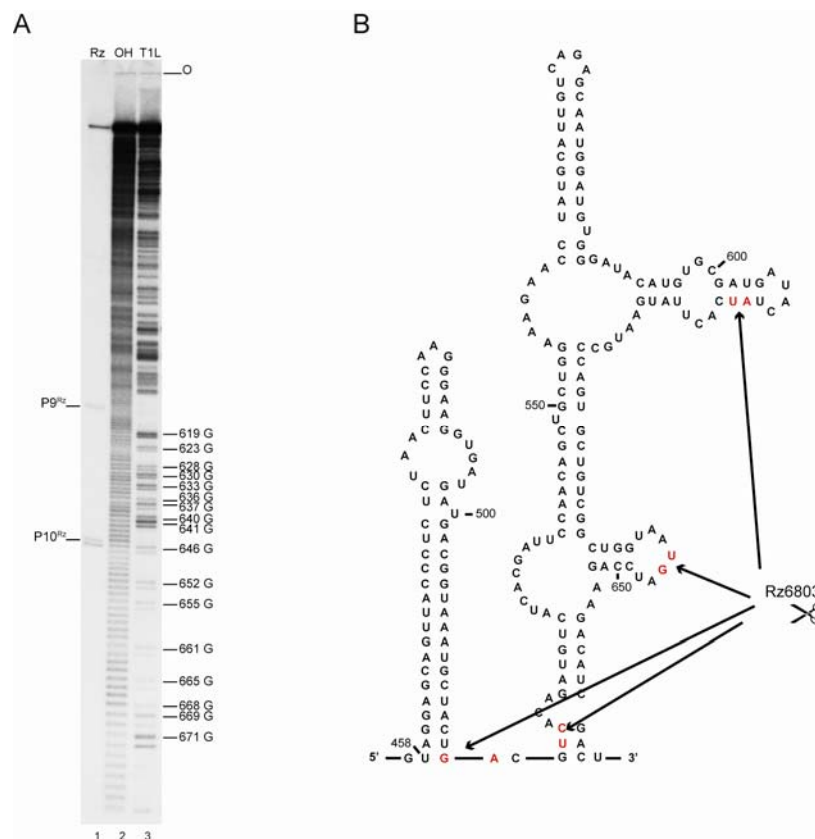


Fig. R.20.- Posiciones de corte del Rz6803. (A) Autorradiografía de un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 10% que muestra la posición del corte que da lugar a las bandas producto P9^{Rz} y P10^{Rz}. Carril 1 (Rz), RNA WNV 1-702^{32P-pCp} incubado con el Rz6803 en condiciones de reacción estándar (apartado M.2.12.3). Carril 2 (OH), hidrólisis alcalina del RNA WNV 1-702^{32P-pCp} (apartado M.2.14.2.4) que

produce un marcador con todos los nucleótidos de la secuencia. Carril 3 (T1L), digestión del RNA WNV 1-702^{32P-pCp} con RNasa T1 en condiciones desnaturalizantes (apartado M.2.14.2.1) que produce un marcador con todas las guaninas de la secuencia que se señalan en el margen del gel. O, indica el origen de la migración electroforética. **(B)** Estructura secundaria predicha por el programa *mfold* para la secuencia reconocida por el Rz6803 en el RNA WNV 1-702. El enlace fosfodiéster donde se producen los cortes del Rz6803 se indica mediante flechas y los nucleótidos que forman parte del enlace se muestran en rojo.

R.2.2.- RNasa P HUMANA

R.2.2.1.- Ensayo de actividad sobre el RNA WNV 1-702

Se probó la actividad de un extracto con actividad RNasa P procedente de células HeLa (RNasa P humana) sobre el fragmento de RNA WNV 1-702. Las reacciones con la RNasa P humana se llevaron a cabo en las condiciones que se indican en el apartado M.2.12.4. Para el ensayo de actividad se utilizó el RNA WNV 1-702 marcado radiactivamente en su extremo 3' con [5'-³²P]-pCp (RNA WNV 1-702^{32P-pCp}) y a lo largo de toda la cadena con [α -³²P]-GTP (RNA WNV 1-702 ^{α 32P-GTP}) a una concentración final de 0'9 nM. La incubación del RNA WNV 1-702 con la RNasa P humana dio lugar a una serie de bandas productos que se pueden observar en los carriles 3 y 6 de la figura R.21. En la figura sólo se indican las bandas producto que conservan el extremo 3' del RNA y que se han denominado P1^P, P2^P, P3^P, P4^P, P5^P, P6^P y P7^P.

Para comprobar que el patrón de corte observado es producido específicamente por la RNasa P humana y no por alguna contaminación del extracto utilizado, se realizó una competición del corte con el precursor del tRNA de la tirosina de *E. coli* (pre-Tyr). El pre-Tyr fue utilizado a concentraciones crecientes (0'9, 9 y 45 nM) en la reacción del RNA WNV 1-702 ^{α 32P-GTP} con la RNasa P humana. El resultado obtenido (Fig. R.21, carriles 7, 8 y 9) muestra que la intensidad de las bandas producto decrece al aumentar la concentración de competidor, reduciéndose el corte a más de la mitad con un exceso de 10 veces de pre-Tyr (carril 8).

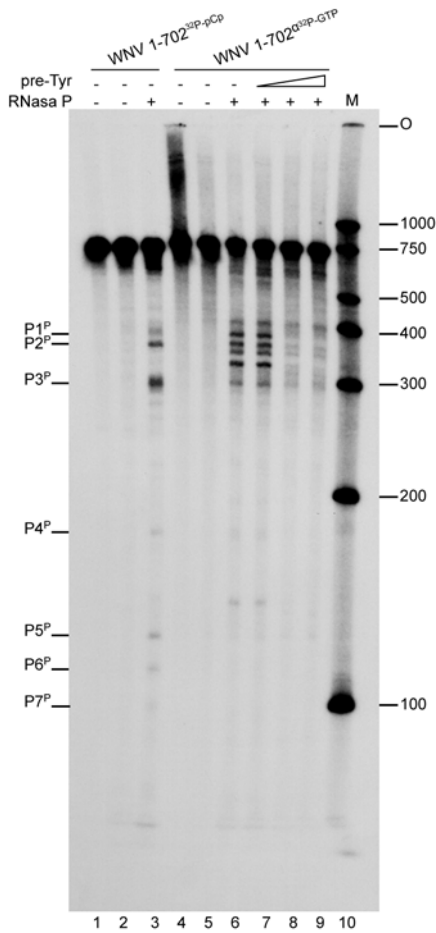


Fig. R.21.- Actividad de la RNasa P humana sobre el RNA WNV 1-702. Autoradiografía de un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 4% que muestra la actividad de la RNasa P humana sobre los RNAs WNV 1-702^{α32P-GTP} y WNV 1-702^{32P-pCp}. Carriles 1, 2 y 3; RNA WNV 1-702^{32P-pCp} incubado en hielo, en tampón de reacción, y con la RNasa P humana respectivamente. Carriles 4, 5 y 6; RNA WNV 1-702^{α32P-GTP} incubado en hielo, en tampón de reacción, y con la RNasa P humana respectivamente. Carriles 7, 8 y 9; competición del corte del RNA WNV 1-702^{α32P-GTP} por la RNasa P humana utilizando las concentraciones crecientes del RNA pre-Tyr de 0.9 nM (carril 7), 9 nM (carril 8) y 45 nM (carril 9). Carril 10 (M), patrón de peso molecular de RNA en número de bases. O, indica el origen de la migración electroforética. Los productos P1^P a P7^P se indican en el margen del gel.

Las posiciones de corte aproximadas para la RNasa P humana han sido estimadas a partir de la movilidad electroforética de las bandas producto en el gel de la Fig. R.21 alrededor de las posiciones 300, 400, 510, 550, 580 y 600 de la secuencia del RNA WNV 1-702. Estas posiciones de corte aproximadas se indican en la figura R.22.

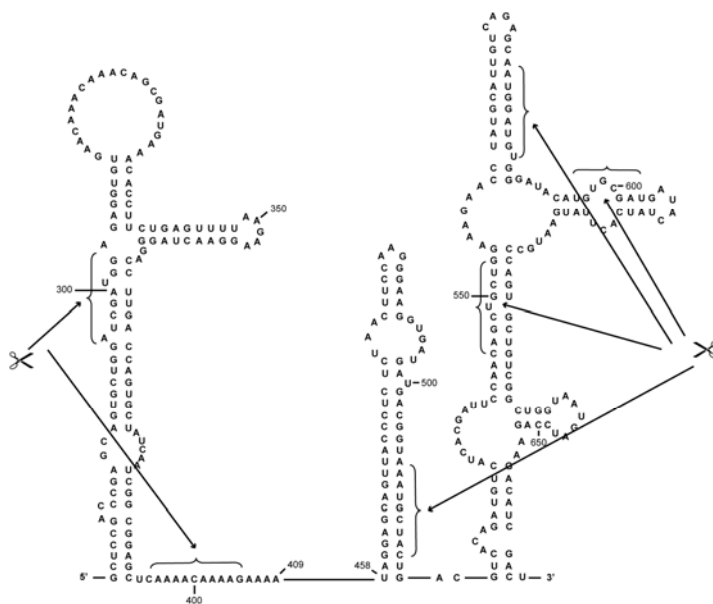


Fig. R.22.- Posiciones de corte de la RNasa P humana. En la figura se indican los cortes aproximados producidos por la RNasa P humana en el RNA WNV 1-702. Se ha representado la estructura secundaria predicha por el programa *mfold* para la secuencia reconocida por la RNasa P humana y las posiciones de corte aproximado en dicha secuencia se indican mediante llaves.

R.3.- ESTUDIO ESTRUCTURAL

R.3.1.- ESTUDIO ESTRUCTURAL DEL RNA WNV 1-702 MEDIANTE ENSAYOS DE HIBRIDACIÓN A MICROARRAYS DE DNA

La estructura del RNA WNV 1-702 fue analizada mediante ensayos de hibridación a microarrays de oligonucleótidos complementarios de DNA. Esta técnica proporciona información sobre la accesibilidad de ciertas regiones del RNA ya que la formación del dúplex entre los oligonucleótidos complementarios y el ácido nucleico no solo está determinado por la complementariedad de secuencia, sino por la estructura secundaria y terciaria del ácido nucleico [Martell *et al.*, 2004]. Esta técnica ha sido utilizada para el estudio estructural de la región 5' del HCV [Martell *et al.*, 2004], HIV-1 [Ooms *et al.*, 2004] y FMDV [Fernandez *et al.*, 2011].

La metodología empleada para la realización de esta técnica se explica detalladamente en el apartado M.2.15. Para la construcción de los microarrays de DNA, se diseñaron 35 oligonucleótidos de DNA complementarios a la región que comprende los primeros 700 nucleótidos del genoma del WNV. Todos los oligonucleótidos se diseñaron con 20 nucleótidos complementarios a la secuencia del WNV y su identificación numérica indica el número de nucleótido en la posición 5' de la secuencia original del WNV. Como controles negativos de la señal de hibridación se incluyeron dos oligonucleótidos sin homología de secuencia al WNV: 1b-24 (complementario al extremo 5' del HCV) y S69R70 (complementario a la región RT del gen pol del HIV-1). Dos concentraciones (5 y 20 μ M) de cada oligonucleótido fueron imprimidas por triplicado en un soporte de vidrio utilizando un GMS 417 Arrayer (Genetic MicroSystems Affymetrix). El RNA WNV 1-702 fue marcado con el reactivo fluorescente Ulysis Alexa 647 (Invitrogen) y su hibridación al microarray de DNA se llevó a cabo en condiciones no desnaturizantes. El resultado fue escaneado utilizando el escáner Genepix 4100 (Fig. R.23.A), y los datos fueron tratados utilizando el programa Genepix pro 6.0.

Se cuantificó la señal de hibridación para tres experimentos independientes. En todos los casos, la señal de fluorescencia fue corregida eliminando la señal de fondo y fue normalizada respecto a la señal del oligonucleótido 101. El resultado obtenido para

la señal producida a la concentración de 20 μM se muestra en la figura R.23.B como la media de los tres experimentos independientes.

El resultado muestra diferentes valores de accesibilidad para la hibridación del RNA WNV 1-702 a los diferentes oligonucleótidos del microarray. La región 5' del RNA WNV 1-702 comprendida por los oligos WNV-1 al WNV-181 presenta regiones de accesibilidad alta-media. La región comprendida por los oligos WNV-201 y WNV-261 presenta un valor de accesibilidad muy bajo, con una señal próxima a la señal de fondo (<0'25). A partir del oligo WNV-281 los valores de accesibilidad son altos, coincidiendo con las regiones que reconocen las RNasas III y P.

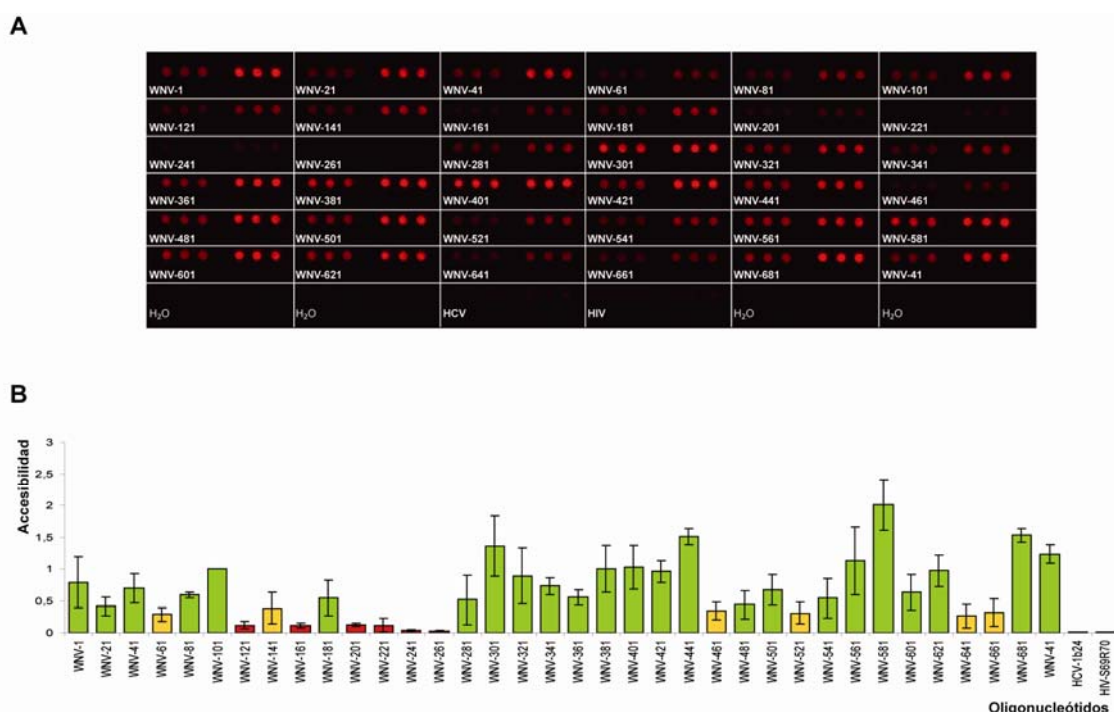


Fig. R.23.- Análisis de la estructura del RNA WNV 1-702 mediante ensayos de hibridación a microarrays de DNA. (A) Señal producida por la hibridación del RNA WNV 1-702, marcado fluorescentemente, con los oligonucleótidos de DNA del microarray. El microarray contiene 35 oligonucleótidos complementarios a la región que comprende los primeros 700 nucleótidos del WNV y su identificación numérica indica el número de nucleótido en la posición 5' de la secuencia original del WNV. La última fila contiene controles negativos de hibridación que incluyen agua y dos oligonucleótidos complementarios a diferentes regiones del HCV y HIV-1. En el microarray aparecen dos concentraciones de cada oligonucleótido por triplicado, 5 μM a la izquierda y 20 μM a la derecha. **(B)** Representación gráfica de la señal de fluorescencia (accesibilidad) para cada oligonucleótido a la concentración de 20 μM . Para cada oligonucleótido se representa la señal normalizada con respecto al oligo WNV-101 para tres experimentos diferentes. Las diferencias en la accesibilidad se muestran en tres colores: verde (mayor de 0'4), naranja (rango entre 0'4-0'25) y rojo (menor de 0'25).

R.3.2.- DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA MEDIANTE MÉTODOS ENZIMÁTICOS

La estructura de los últimos ~250 nucleótidos del RNA WNV 1-702 se estudió utilizando una colección de RNAsas específicas de simple y doble cadena. En esta región se alternan zonas de accesibilidad alta y media, y es la zona donde se acumulan la mayoría de los cortes de las RNAsas III y P.

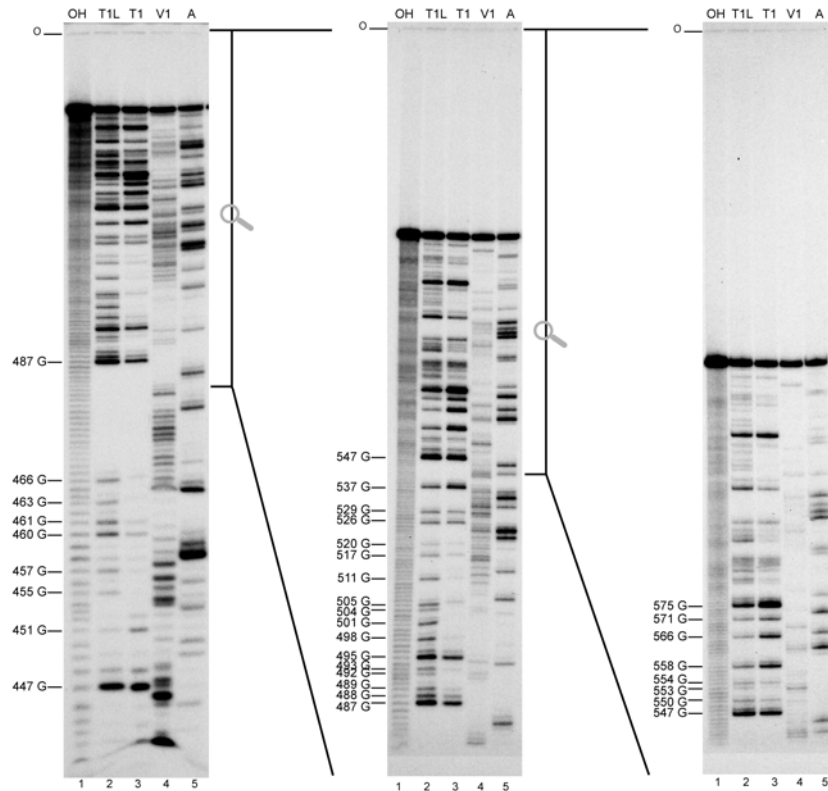
El RNA motivo de estudio fue sometido a una digestión limitada con las nucleasas T1, V1 y A (apartado M.2.14.2). El requerimiento más importante para la realización de estos experimentos es utilizar un RNA marcado únicamente en uno de sus extremos. Debido a limitaciones experimentales para acceder a la información de toda la longitud desde el extremo 3' o 5' del RNA WNV 1-702, otros dos RNAs fueron utilizados para este estudio. El RNA WNV 440-690 (apartado M.1.4.1.2) y el RNA WNV 450-671 (apartado M.1.4.1.3) comprenden los nucleótidos 440 al 690 y 450 al 671 del genoma del WNV respectivamente. Antes de ser utilizados en este estudio, se comprobó que estos RNAs tenían la misma predicción estructural utilizando el programa *mfold*, y que eran reconocidos y procesados por la RNasa III y RNasa P en la misma posición que en el RNA de longitud completa (RNA WNV 1-702). Ya que los resultados obtenidos tanto para el RNA WNV 440-690 como para el RNA WNV 450-671 fueron similares, en esta memoria de Tesis Doctoral sólo se mostrarán los resultados obtenidos para el RNA WNV 440-690 y el RNA WNV 1-702.

El RNA WNV 1-702 marcado en su extremo 3' con [5'-³²P]-pCp (RNA WNV 1-702^{32P-pCp}) y el RNA WNV 440-690 marcado tanto en su extremo 5' con [γ -³²P]-GTP (RNA WNV 440-690 ^{γ 32P-GTP}) como en su extremo 3' con [5'-³²P]-pCp (RNA WNV 440-690^{32P-pCp}) fueron sometidos a una digestión parcial con las RNAsas T1, V1 y A en las condiciones de reacción que se detallan en el apartado M.2.14.2 para cada una de ellas. Los productos de reacción se resolvieron mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 10% o 6% dependiendo de la de la región del RNA que se quiso resolver. Los RNAs fueron sometidos también a una hidrólisis alcalina limitada (apartado M.2.14.2.4) y a una digestión con RNasa T1 en condiciones desnaturalizantes (apartado M.2.14.2.1) para producir un marcador con todos los nucleótidos o todas las guaninas de la secuencia del RNA respectivamente. Los resultados obtenidos para las digestiones de cada RNA se muestran en la figura R.24. Estos resultados se acomodan con la predicción realizada por el programa *mfold* (apartado M.1.8) para la región estudiada del RNA WNV 1-702, y en la figura R.25 se

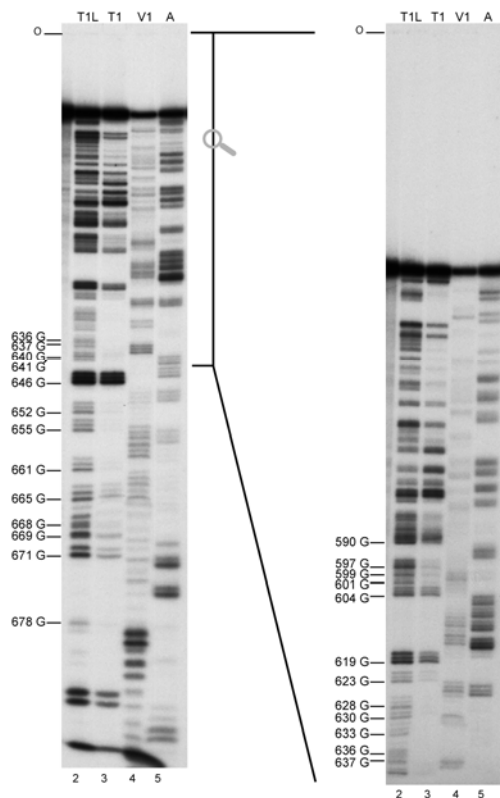
Resultados

superponen los resultados obtenidos para ambos métodos de determinación de estructura secundaria.

A) RNA WNV 440-690^{32P}-GTP



B) RNA WNV 440-690^{32P}-pCp



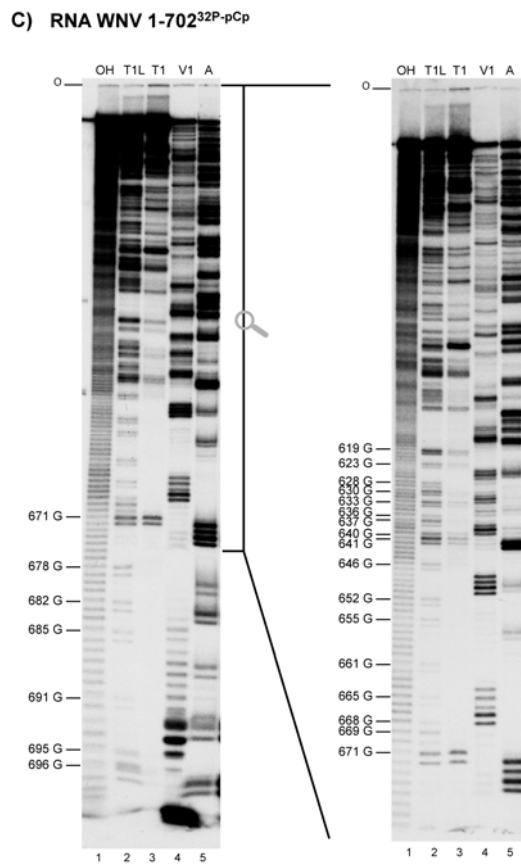


Fig. R.24.- Estudio estructural con RNAsas dependientes de simple y doble cadena. En la figura se muestra la digestión de cada RNA con las RNAsas T1, V1 y A. Los productos de reacción se resolvieron en geles desnaturalizantes al 6% o 10% dependiendo de la región del RNA que se quiso resolver. **(A)** RNA WNV 440-690^{32P-GTP} en gel al 10% (autorradiografía de la izquierda) y dos geles al 6% (autorradiografías del centro y derecha) **(B)** RNA WNV 440-690^{32P-pCp} en gel al 10% (autorradiografía de la izquierda) y al 6% (autorradiografía de la derecha) **(C)** RNA WNV 1-702^{32P-pCp} en dos geles al 10%. Los carriles de todos los geles muestran una digestión del RNA en condiciones nativas con las RNAsas T1 (carril 3), V1 (carril 4) y A (carril 5); una digestión del RNA en condiciones desnaturalizantes con la RNasa T1 (carril 2); y una hidrólisis alcalina del RNA (carril 1). O, indica el origen de la migración electroforética en todos los geles. En el margen de cada gel se indica la posición de las guaninas en la secuencia del RNA. Los cortes con las diferentes RNAsas se resumen en la Fig. R.25.

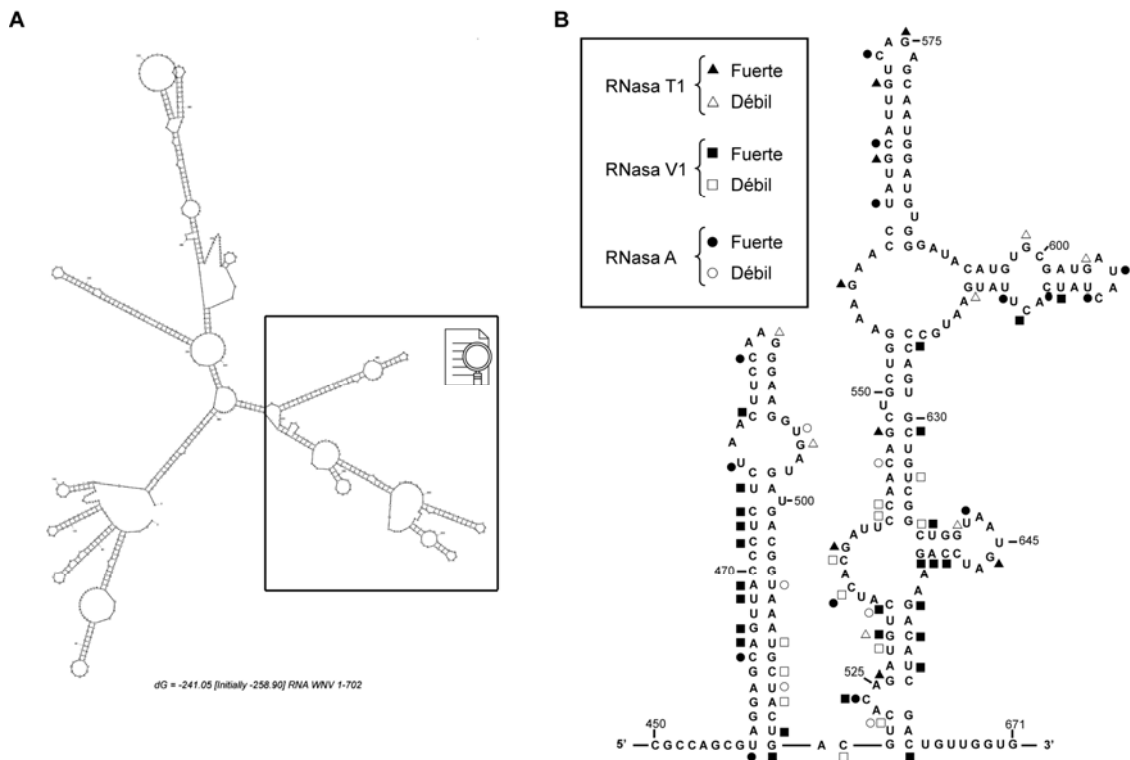


Fig. R.25.- Resumen de los diferentes cortes realizados por las RNasas T1, V1 y A. (A) Predicción de la estructura secundaria del RNA WNV 1-702 por el programa *mfold*. La región que se ha estudiado con las diferentes RNasas se enmarca en un rectángulo. **(B)** Los resultados de la Fig. R.24 se resumen sobre la estructura secundaria predicha por el programa *mfold* para la región que comprende los nucleótidos 450 al 671 del RNA WNV 1-702. Se ha reducido la región representada para obviar pequeñas diferencias debidas al plegamiento en la estructura que adquieren los extremos en los diferentes RNAs empleados en el estudio. Los cortes realizados por la RNasa T1 se representan mediante triángulos, los cortes realizados por la RNasa V1 se representan mediante cuadrados, y los cortes realizados por la RNasa A se representan mediante círculos.

De los resultados obtenidos (Fig. R.25) se deduce que el motivo estructural reconocido por las RNasas III consiste en un tallo largo con un lazo interno, que a partir de ahora denominaremos M(458-517). La estructura secundaria reconocida por las RNasas P en la región 3' del RNA WNV 1-702 es más compleja y está formada por dos lazos internos y tres tallos-lazos [M(520-663)].

R.3.3.- ANÁLISIS DE LA PRESENCIA DE POSIBLES *PSEUDOKNOTS* EN LOS MOTIVOS ESTRUCTURALES RECONOCIDOS POR LAS RNAsas P

Las estructuras tipo tRNA, reconocidas por las enzimas RNasa P, de varios RNAs virales están localizadas en la proximidad de *pseudoknots* que crea organizaciones estructurales complejas [Mans et al., 1990]. Esto nos llevó a buscar posibles *pseudoknots* en los primeros 702 nucleótidos del genoma del WNV. Los *pseudoknots* se producen por un apareamiento de los lazos encerrados en tallos del RNA con regiones complementarias, también desapareadas, en otra parte de la cadena del RNA [Pleij and Bosch, 1989]. Específicamente, un *pseudoknot* es definido por al menos dos pares de bases, $i-j$ e $i'-j'$, de tal manera que el nucleótido i aparece antes que i' , i' antes que j , y j antes que j' en la secuencia del RNA [Bellaousov and Mathews, 2010]. Para este estudio se ha utilizado un programa informático que utiliza un algoritmo capaz de predecir *pseudoknots* (ProbKnot) [Bellaousov and Mathews, 2010]. Este algoritmo ha permitido encontrar una posible estructura *pseudoknot* que implica la interacción de los nucleótidos presentes en el lazo interno del motivo estructural M(458-517) y uno de los lazos internos del motivo M(520-663). Los nucleótidos implicados en esta interacción están formados por las parejas G493 con C536, U494 con A535, G495 con C534, A496 con U533, U497 con A532, G498 con C531 y A499 con U530. La figura R.26 muestra las interacciones implicadas en esta posible estructura *pseudoknot*.

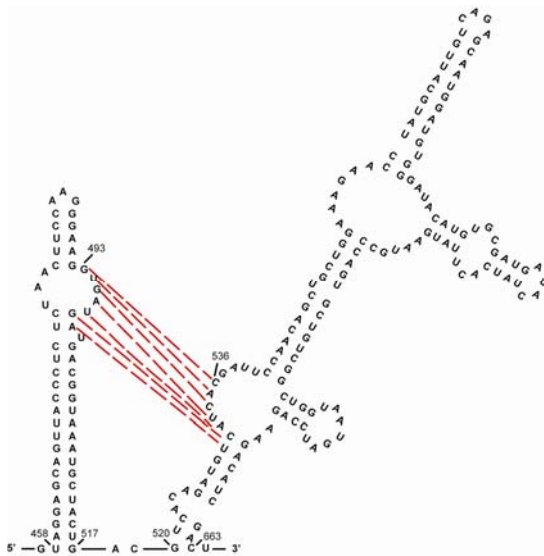


Fig. R.26.- Posible *pseudoknot* en el RNA WNV 1-702. Las interacciones implicadas en el *pseudoknot*, según el algoritmo ProbKnot [Bellaousov and Mathews, 2010], se representan con una línea discontinua de color rojo.

D.- DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos del trabajo realizado en esta memoria de Tesis Doctoral han confirmado la existencia de diferentes motivos estructurales presentes en los primeros 702 nucleótidos del genoma del WNV que son reconocidos y procesados por enzimas miembros de las familias RNasa III y RNasa P. A lo largo de este capítulo se discutirán los resultados obtenidos para cada una de las RNasas utilizadas, la estructura y conservación de los motivos reconocidos y su relación con los de otros virus de la familia *Flaviviridae*.

D.1.- MOTIVOS ESTRUCTURALES RECONOCIDOS POR LA RNasa III

RNasa III de *Escherichia coli*

La incubación del RNA WNV 1-702 con la Ec-RNasa III dio lugar a un patrón de corte con cuatro bandas producto que denominamos P1^{RNasaIII}, P2^{RNasaIII}, P3^{RNasaIII} y P4^{RNasaIII} (Fig. R.1). Estos productos de reacción son específicos del corte de la Ec-RNasa III como se pudo comprobar mediante ensayos de competición con sustratos de dsRNA específicos para dicha ribonucleasa y el estudio de los grupos químicos de los extremos del RNA que quedan tras el corte (5'-fosfato y 3'-hidroxilo) (apartado R.1.1.3).

El patrón de corte observado tras el procesamiento del RNA WNV 1-702 por la Ec-RNasa III se produce como consecuencia de un solo corte o dos cortes ligados al mismo motivo estructural del RNA WNV 1-702 (apartado R.1.1.5). La estructura secundaria de este motivo que hemos denominado M(458-517) se ha estudiado más detalladamente utilizando una colección de RNasas específicas de simple y doble cadena. Este estudio ha revelado una disposición estructural que consiste en un tallo

largo con un lazo interno (Fig. R.25). En este tallo, la Ec-RNasa III produce un corte entre los nucleótidos C471-C472 y otro corte entre los nucleótidos G505-U506 (apartado R.1.1.7). Este motivo es compatible con la estructura característica de los sustratos para la RNasa III como el caso del precursor temprano del mRNA policistrónico del bacteriófago T7 (Fig. I.7.B).

RNasa III eucariota Dicer

La incubación del RNA WNV 1-702 con la RNasa eucariota Dicer generó varios productos de reacción *in vitro* (Fig. R.10). El estudio de la especificidad de dichos productos mostró que sólo las bandas producto P3^{Dicer} y P9^{Dicer} desaparecían al incorporar en la reacción un competidor específico para esta ribonucleasa (apartado R.1.2.2.1). Los productos P3^{Dicer} y P9^{Dicer} parecen ser los fragmentos resultantes del único corte de Dicer, ya que la migración electroforética de cada uno de dichos productos suma la longitud completa del RNA WNV 1-702. El estudio de los grupos químicos de los nuevos extremos generados para la banda producto P9^{Dicer} (5'-fosfato y 3'-hidroxilo) confirmaron la especificidad del corte. El resto de productos observados en la reacción pueden deberse a alguna actividad no deseada de la enzima recombinante o a una contaminación en el extracto comercial. El punto de corte exacto que daba lugar a la banda producto P9^{Dicer} se localizó entre los nucleótidos G505-U506 (apartado R.1.2.3) que coincidió con uno de los cortes producidos también por la Ec-RNasa III en el mismo motivo estructural (Fig. D.1).

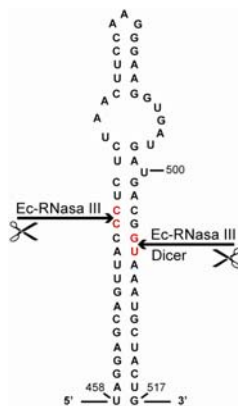


Fig. D.1.- Posiciones de corte de la Ec-RNasa III y Dicer. En la figura se indican los cortes producidos por la Ec-RNasa III y Dicer en el motivo estructural tipo tallo de la secuencia del RNA WNV 1-702. El enlace fosfodiéster donde se produce el corte se indica con una flecha y los nucleótidos que forman parte del enlace se muestran en rojo. El corte se produce entre los nucleótidos C471-C472 y G505-U506 para la Ec-RNasa III y entre los nucleótidos G505-U506 para Dicer.

El hecho de que ambas RNasas produzcan un corte en la misma posición del RNA WNV 1-702 no es extraño ya que, aunque difieren en la complejidad de dominios, comparten los dominios más simples que son el dsRBD y el dominio catalítico. Un experimento realizado en el transcurso de esta Tesis descartó además que existiera contaminación cruzada entre ellas. La incubación de 50 ng del RNA L-A, un RNA de doble cadena largo [Wickner, 2007], con 0'5 U de enzima Dicer o con 0'0001, 0'0005 y 0'001 U/μl de Ec-RNasa III en las condiciones de reacción estándar utilizadas en este trabajo para cada una de ellas, mostró que dicho RNA es procesado por la Ec-RNasa III pero no por la enzima Dicer (Fig. D.2).

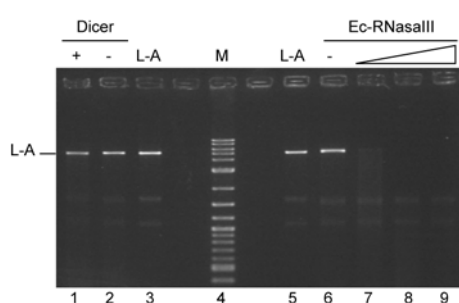


Fig. D.2.- Gel de agarosa al 1'3% que muestra la actividad de la enzima Dicer (carriles 1-3) y la Ec-RNasa III (carriles 5-9) sobre 50 ng de RNA L-A. El RNA L-A fue incubado en hielo (carriles 3 y 5), en tampón de reacción (carriles 2 y 6) y en presencia de Dicer a 0'5 U (carril 1) o de Ec-RNasa III a una concentración final de 0'0001, 0'0005 y 0'001 U/μl (carriles 7, 8 y 9 respectivamente). Carril 4 (M), patrón de peso molecular 2-Log DNA Ladder (NEB). La migración electroforética del RNA L-A se indica en el margen del gel.

Que la RNasa III eucariota Dicer reconozca y procese el RNA WNV 1-702 *in vitro* plantea la pregunta de si también existirá este reconocimiento *in vivo*. Si fuese así, este tallo estaría implicado en el proceso de interferencia del RNA (RNAi). Un estudio relativamente reciente ha demostrado que la infección de células *Drosophila melanogaster* por WNV induce una respuesta de RNAi mediada por siRNA que inhibe la infección [Chotkowski *et al.*, 2008]. Aunque en este trabajo se utilizaron sondas que hibridaban con la región de la proteína NS1, para detectar pequeños RNAs de ~25 nucleótidos de longitud homólogos al WNV, no habría que descartar que una posible fuente de siRNA fuera el tallo estudiado en este trabajo. Sin embargo, en células de mosquito *Aedes albopictus* infectadas con WNV no se detectaron estos pequeños RNAs [Chotkowski *et al.*, 2008]. El WNV probablemente ha evolucionado para evadir la vía de RNAi en su hospedador natural, el mosquito. Y, aunque el WNV también podría expresar un inhibidor de la vía de RNAi, éste todavía no se ha encontrado y parece que se debe más a evasión que a supresión de la vía RNAi.

D.2.- MOTIVOS ESTRUCTURALES RECONOCIDOS POR LA RNasa P

Subunidad RNA de la RNasa P de *Synechocystis* sp.

La incubación del RNA WNV 1-702 con el Rz6803 dio lugar a varios productos de reacción *in vitro* (Fig. R.15). Los productos estudiados en este trabajo eran producidos específicamente por el Rz6803 (apartado R.2.1.3) comprobándose mediante el estudio de los grupos químicos de los nuevos extremos del RNA que quedan tras el corte (5'-fosfato y 3'-hidroxilo) y un estudio de dependencia de iones monovalentes (K^+) y divalentes (Mg^{2+}) necesarios para el corte del Rz6803. Las posiciones de corte en la secuencia del RNA WNV 1-702 se encontraron entre los nucleótidos A610-U611, U645-G646, G517-A518 y U521-C522. El motivo estructural M(520-663) donde se producen estos cortes se ha estudiado mediante métodos enzimáticos utilizando una colección de RNasas específicas de simple y doble cadena. Este estudio reveló que el dominio reconocido por el Rz6803 presenta una estructura compleja formada por dos lazos internos y tres tallos-lazos (Fig. R.25).

RNasa P humana

El estudio llevado a cabo con la RNasa P humana también dio lugar a una serie de bandas producto específicas para esta RNasa (Fig. R.21). El corte de la RNasa P humana para dar lugar a las bandas producto $P4^P$ (~510), $P5^P$ (~550), $P6^P$ (~580) y $P7^P$ (~600) se produce en el mismo motivo reconocido por el Rz6803 [M(520-663)], y la banda producto $P4^P$ parece coincidir con la banda producto $P8^{Rz}$ del Rz6803. Sin embargo, el corte que produce la RNasa P humana para dar las bandas producto $P1^P$, $P2^P$ (~300) y $P3^P$ (~400) se encuentra en otro motivo estructural corriente arriba que hemos denominado M(274-393). Esta diferencia en cuanto al reconocimiento de motivos por parte de la RNasa P humana y del Rz6803 podría explicarse en base a dos posibilidades. Una de ellas es que se han utilizado dos miembros de la familia RNasa P alejados evolutivamente y con una composición diferente. La RNasa P humana consiste en un RNA y diez subunidades proteicas, mientras que el Rz6803 sólo tiene la subunidad de RNA. Aunque el papel de los componentes proteicos de la RNasa P eucariota no está claro, en el caso de la RNasa P bacteriana el componente

proteico de la ribonucleasa modifica la especificidad de sustrato y aumenta la eficiencia catalítica [Altman and Kirsebom, 1999; Niranjanakumari et al., 1998]. Teniendo esto en cuenta, las subunidades proteicas de la RNasa P humana podrían ser la causa del reconocimiento de este otro motivo estructural. Otra posibilidad a tener en cuenta son las condiciones de reacción empleadas. La concentración de sales (K^+ y Mg^{2+}) presente en la reacción, que es diferente tanto para el Rz6803 como para la RNasa P humana, pueden afectar a la estructura del RNA sustrato.

Los motivos estructurales M(274-393) y M(520-663) mimetizan los requerimientos necesarios para el reconocimiento por la RNasa P y podrían sugerirse como motivos tipo tRNA. Estos motivos se localizan en la proximidad de *pseudoknots* de varios RNAs virales [Mans et al., 1990]. En el caso del RNA WNV 1-702, el algoritmo del programa informático ProbKnot [Bellaousov and Mathews, 2010] ha permitido encontrar una posible estructura *pseudoknot* en la que interviene el motivo M(520-663) (Fig. R.26).

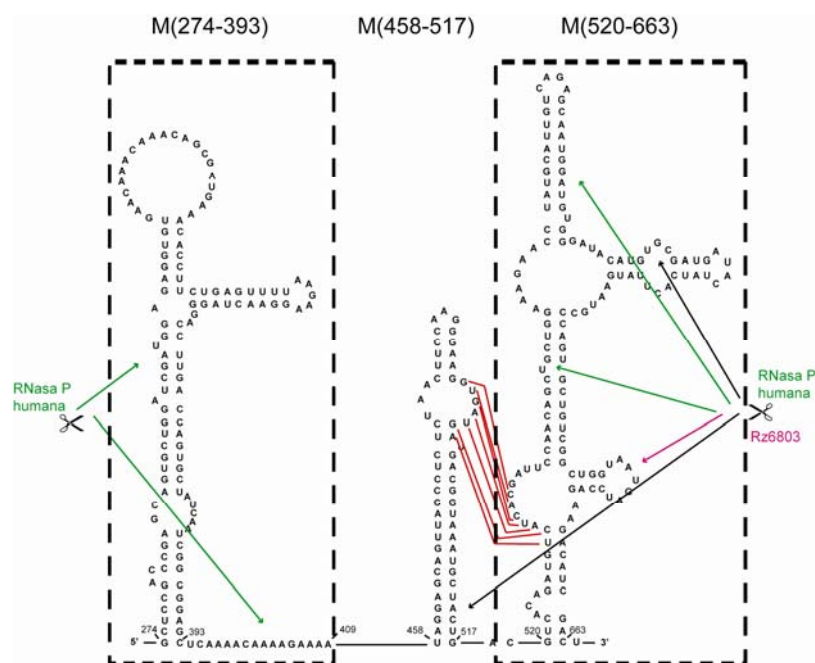


Fig. D.3.- Motivos estructurales reconocidos por la RNasa P. Los recuadros con líneas discontinuas encierran la estructura secundaria de los motivos M(274-393) y M(520-663) reconocidos por la RNasa P humana y Rz6803 en el RNA WNV 1-702. Los cortes aproximados para cada una de ellas se indican mediante flechas: color verde para la RNasa P humana; color rosa para el Rz6803; color negro para ambas. Las líneas rojas muestran un posible *pseudoknot* que implica la interacción de varios nucleótidos del motivo estructural M(520-663) y M(458-517).

D.3.- ANÁLISIS DE COVARIACIÓN

La secuencia del RNA WNV 1-702 correspondiente a los motivos estructurales M(458-517) y M(520-663) se comparó con la correspondiente a otros miembros del linaje 1 y 2 del WNV con el fin de identificar posiciones covariantes. Estas posiciones son un fuerte indicativo de interacciones Watson-Crick y se utilizan para reforzar los datos de estructura obtenidos por el programa *mfold* y las diferentes RNAsas. La tabla D.1 recoge las características de los representantes elegidos para cada linaje del WNV y en la figura D.4 se muestra el alineamiento de secuencia entre los nucleótidos 421 al 702 realizado con el programa informático Clustal W2 (apartado M.1.8) para todos ellos. Se eligió esta región por ser la zona estudiada con las RNAsas dependientes de estructura. Este alineamiento revela una serie de diferencias en la secuencia de nucleótidos con respecto a la del RNA WNV 1-702 y, como era de esperar, la mayor variabilidad se produce para los miembros del linaje 2. Entre el linaje 1 las mayores diferencias se establecen con el representante del WNV extendido por Australia conocido como virus Kunjin.

Tabla D.1

Lista de virus utilizada para el análisis de covariación

	Linaje	Virus	Nº de acceso al GenBank
P	1	RNA WNV 1-702 (strain NY99)	
Q	1	WNV France strain PaAN001	AY268132
R	1	Kunjin virus	AY274505
S	2	WNV Uganda strain B956	AY532665
W	2	WNV goshawk-Hungary/04	DQ116961

```

P      ACCGGAATTGCAGTCATGATTGGCCTGATCGCCAGCGTAGGAGCAGTTACCCCTCTCTAAC 480
Q      ACCGGAATTGCAGTCATGATCGGCCTGATTGCTAGCGTAGGAGCAGTTACCCCTCTCTAAC 460
R      ACCGGAATTGCATTCATGATTGGCTTGATTGCTGGCGTGGGAGCAGTCACCTCTCTCCAAC 480
S      GCGGGCTTTACTATCTTGCTTGGGCTGATCGCCTGTGCTGGAGCTGTGACCCCTCTCGAAC 480
W      GCGGGCTTTACTATCTTGCTTGGGCTGATCGCTTGTGCTGGAGCTGTGACCCCTCTCGAAC 480
      * ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

P      TTCCAAGGGAAAGGTGATGATGACGGTAAATGCTACTGACGTCACAGATGTCATCAGGATT 540
Q      TTCCAAGGGAAAGTTATGATGACGGTAAATGCTACTGACGTCACAGATGTTATCAGGATT 520
R      TTCCAAGGGAAAGGTGATGATGACGGTAAACGCTACTGACGTCACAGACATTATCAGGATA 540
S      TTCCAAGGGCAAAGTATGATGACAGTCAATGCAACCGATGTCAGTACGCTGATTACCATT 540
W      TTCCAAGGGCAAAGTATGATGACAGTCAATGCAACCGATGTCAGTACGCTGATTACCATT 540
      ** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

P      CCAACAGCTGCTGGAAAAGAACCTATGCATTGTCAGAGCAATGGATGTGGGATACATGTGC 600
Q      CCAACAGCTGCTGGAAAAGAACTATGCATTGTCAGAGCAATGGATGTGGGATACATGTGT 580
R      CCAACGGCCGCTGGAAAAGAACCTGTGCATTGTCAGAGCTATGGATGTGGGGCACATGTGT 600
S      CCAACAGCTGCTGGAAAAGAACCTGTGCATCGTAAGGGCTATGGACGTAGGATACCTTTGT 600
W      CCAACAGCTGCTGGAAAAGAACCTGTGCATTGTAAGGGCTATGGACGTGGGATACCTTTGT 600
      ***** ** ***** ** ** * * ***** ** ** * * ***** ** ** * * **

P      GATGATACTATCACTTATGAATGCCAGTGTGCTCGGCTGGTAATGATCCAGAAGACATC 660
Q      GATGACACTATCACTTATGAATGCCAGTGTGCTCGGCGGTAATGATCCAGAAGACATC 640
R      GATGATACTATCACCTATGAATGTCCAGTGTGCTCGGCGGAAATGATCCAGAAGACATT 660
S      GAGGATACTATCACTTATGAATGTCCGGTCTAGCTGCTGGAAATGACCCTGAAGACATT 660
W      GAGGATACTATCACTTATGAATGTCCGGTCTAGCTGCTGGAAATGACCCTGAAGACATT 660
      ** ** ***** ***** ** ** * * ** * * ***** ** * *****

P      GACTGTTGGTGCACAAAAGTCAGCAGTCTACGTCAGGTATGGA----- 702
Q      GACTGTTGGTGCACAAAAGTCAGCAGTCTACGTCAGGTATGGAAGATGCACCAAGACACGC 700
R      GACTGCTGGTGCACGAAAGTTAGCAGTCTACGTTAGGTATGGA----- 702
S      GACTGCTGGTGCACGAAATCATCTGTTTACGTGCGCTATGGA----- 702
W      GACTGCTGGTGCACGAAATCATCTGTTTACGTGCGCTATGGA----- 702
      ***** ***** ** * * * * * ***** * *****

```

Fig. D.4.- Alineamiento de la secuencia de nucleótidos de los motivos estructurales M(458-517) y M(520-663) en miembros del linaje 1 y 2 del WNV. La secuencia del RNA WNV 1-702 (P) se ha alineado con otros miembros del linaje 1 (Q y R) y otros miembros del linaje 2 (S y W) cuyas características se muestran en la Tabla D.1. El alineamiento de secuencias se ha realizado utilizando el programa informático ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Los asteriscos indican los nucleótidos conservados en todos los virus.

La figura D.5.A muestra la estructura secundaria de la región estudiada en la que se indican exclusivamente los cambios que se producen en las regiones apareadas por ser estos cambios los que pueden alterar dicha estructura. Mediante un código de colores se indica si la sustitución que se produce es compensatoria (rosa), no compensatoria (azul) o si se produce una covariación (rojo). Todos los casos en los que aparecen dos recuadros para la misma pareja de nucleótidos se tratan de sustituciones compensatorias en el caso del linaje 1 y sustituciones no compensatorias en el caso del linaje 2. La mayoría de los casos con sustituciones no compensatorias se producen para el linaje 2.

En el motivo estructural M(458-517), y para el caso del linaje 1, se producen una serie de sustituciones que tienden a mantener la estructura de dicho motivo. Para el linaje 2 se producen una serie de sustituciones no compensatorias que disminuyen la estabilidad de este motivo. La pareja de nucleótidos en las posiciones 468 y 507 parece ser importante ya que tanto para el linaje 1 como para el linaje 2 se produce una covariación. Esta posición se encuentra a un nucleótido de distancia del corte producido por la RNasa III (corte producido entre los nucleótidos 505 y 506). Resulta llamativo que los cambios que se producen en este motivo estructural afectan siempre la tercera posición del codón de la proteína prM (incluso para los cambios que se producen en la zona desapareada de la estructura secundaria y que no se muestra en la figura) sugiriendo que la secuencia de la proteína correspondiente a este fragmento debe ser esencial.

El motivo estructural M(520-663) también presenta una pareja de nucleótidos, en las posiciones 564 y 585, en la que se produce una covariación y que pudiera ser importante. Para este motivo estructural también se producen numerosas sustituciones no compensatorias en el caso del linaje 2 que no disminuyen especialmente la estabilidad y parece no alterar gravemente la estructura de dicho elemento.

El programa *mfold* ofrece otro posible plegamiento alternativo de menor estabilidad para el RNA WNV 1-702 (Fig. D.5.B) y se examinó la coherencia de las sustituciones en esta estructura (Fig. D.5.C). Comprobamos que, exceptuando pocos casos, se sigue manteniendo este patrón de sustituciones no compensatorias en la estructura secundaria. Además, los resultados obtenidos en el apartado R.3.2 para la protección con las RNasas T1, V1 y A no concuerdan especialmente con esta otra estructura.

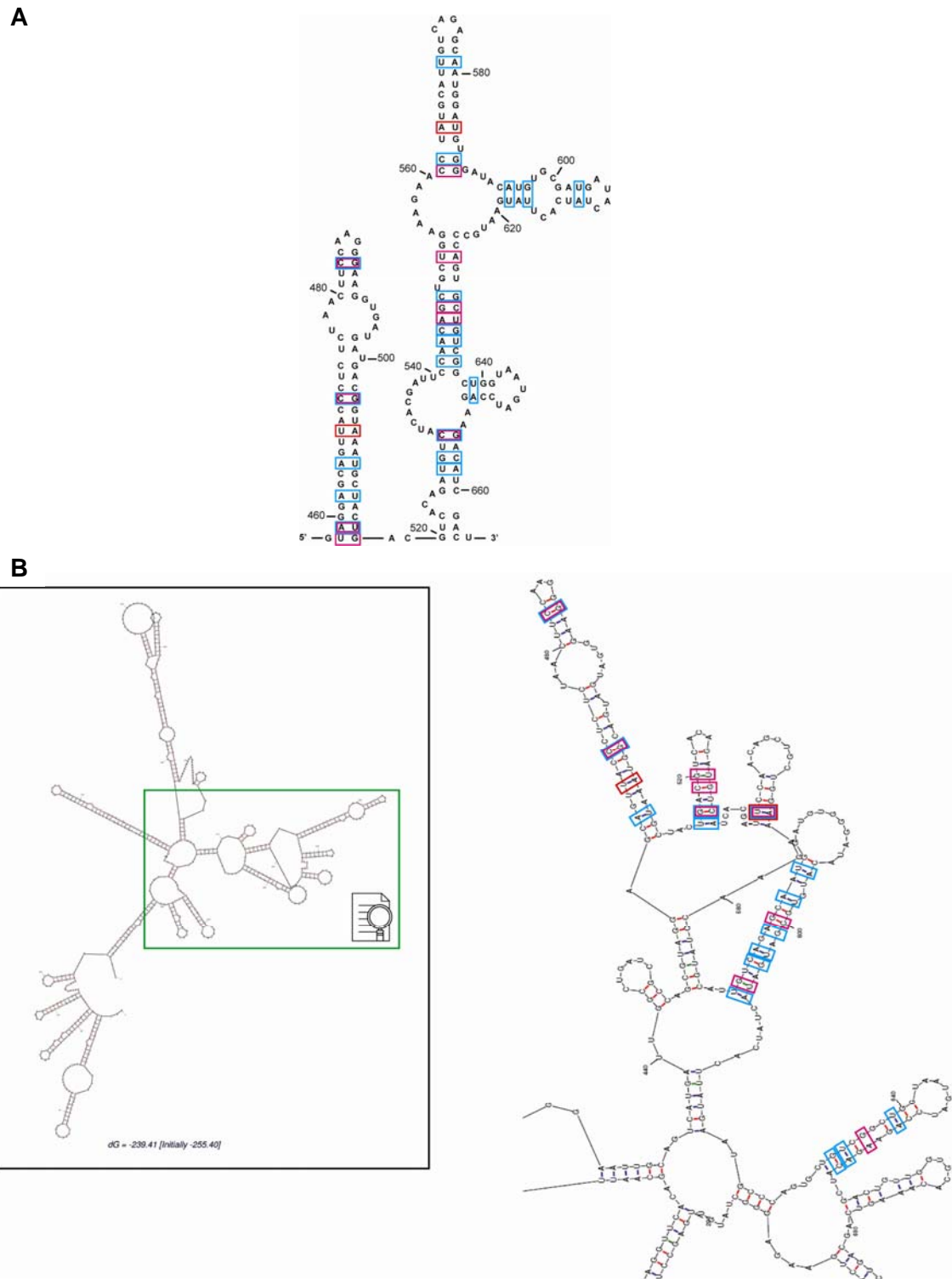


Fig. D.5.- Análisis de covariación para los motivos estructurales M(458-517) y M(520-663) del RNA WNV 1-702 en relación a otros miembros del linaje 1 y 2. (A) Motivos estructurales M(458-517) y M(520-663) descritos a lo largo de este trabajo. (B) Predicción realizada por el programa *mfold* de otro posible plegamiento de la estructura secundaria del RNA WNV 1-702. (C) Estructura correspondiente a la región que comprenden los motivos M(458-517) y M(520-663) en el nuevo plegamiento (B). En la figura se indican las variaciones de nucleótidos que tienen lugar en regiones apareadas de la estructura secundaria mediante recuadros de color azul para las sustituciones no compensatorias; rosa, para las sustituciones compensatorias; y rojo, para los casos de covariación.

D.4.- ACCESIBILIDAD DE LAS REGIONES DEL RNA WNV 1-702

El resultado obtenido mediante ensayos de hibridación del RNA WNV 1-702 a microarrays de oligonucleótidos complementarios de DNA muestra diferentes regiones de accesibilidad en el RNA WNV 1-702 (Fig. R.23 del apartado R.3.1). Dependiendo del grado de accesibilidad del RNA, se pueden distinguir regiones de mayor o menor estabilidad. Las regiones comprendidas entre los oligos WNV-281 y WNV-381, y los oligos WNV-521 y WNV-661 presentan una señal de hibridación alta. Estas regiones coinciden con los dos motivos estructurales M(274-393) y M(520-663) reconocidos por las RNasas P. La región comprendida entre los oligos WNV-461 y WNV-501, región que coincide con el motivo estructural M(458-517) reconocido por la RNasa III, también presenta una accesibilidad alta.

Aunque los primeros 300 nucleótidos del genoma del WNV no han sido motivo de estudio de esta memoria de Tesis Doctoral, a continuación se comentan también los resultados obtenidos con los microarrays. El conocimiento que se tiene de la estructura que forman los primeros 200 nucleótidos del WNV [Dong *et al.*, 2008] (Fig. I.3) muestra una región bastante estructurada formada por varios tallos-lazos. El resultado que se obtiene del estudio con microarrays para esta zona es el de una región de accesibilidad alta-media. Las regiones 5'UAR, 5'DARI y 5'DARII, implicadas en interacciones a larga distancia con regiones presentes en el extremo 3' del WNV (apartado I.1.2.4, Fig. I.3), se encuentran en la zona que abarcan los oligos WNV-81 y WNV-101 que presenta una accesibilidad alta. Sin embargo, la región 5'CS implicada también en una interacción a larga distancia con otra región del extremo 3' se encuentra en una zona poco accesible que comprenden los oligos WNV-121 y WNV-141. El hecho de que el oligo WNV-121 sea complementario tan solo en 6 nucleótidos a esta región y el oligo WNV-141 a los otros 6, puede que no sea suficiente para determinar su accesibilidad. La región del RNA WNV 1-702 comprendida por los oligos WNV-201 y WNV-261 presenta un valor de accesibilidad bastante bajo (<0'25). La estructura que se obtiene del plegamiento de esta región con el programa *mfold* (Fig. R.25.A) muestra la existencia de un tallo-lazo bastante estable (-41'40 Kcal/mol), lo que explicaría la baja señal de hibridación con los oligonucleótidos.

D.5.- MOTIVOS ESTRUCTURALES RECONOCIDOS POR LAS RNAsas III Y P EN LA REGIÓN 5' DE LA FAMILIA *Flaviviridae*

La familia *Flaviviridae* está formada por los géneros *Flavivirus*, *Pestivirus* y *Hepacivirus* (Tabla I.1). Los miembros de estos géneros presentan diferencias tanto a nivel de secuencia como de organización genómica. El género *Flavivirus* (género al que pertenece el WNV) presenta una región 5' no traducible corta y su traducción es dependiente de una estructura cap tipo 1. Los géneros *Hepacivirus* (al que pertenece el HCV) y *Pestivirus* (género al que pertenecen CSFV y BVDV) controlan la traducción mediante un sitio de entrada interna al ribosoma (IRES) en la región 5' no traducible. Las estructuras IRES del HCV y pestivirus muestran una estructura parecida a pesar de no ser comparables a nivel de secuencia. También existen diferencias en cuanto a las proteínas para las que codifican tras el codón de inicio AUG: cápsida en el caso de flavivirus y hepacivirus, y la proteína N^{pro} en el caso de los pestivirus (Fig. D.7.B). Los resultados obtenidos en este trabajo han permitido encontrar varios motivos estructurales reconocidos por miembros de la familia RNasa III y P en la región 5' del RNA genómico del WNV. Otros estudios también han demostrado que estas ribonucleasas reconocen varios motivos estructurales en la región 5' de los otros dos géneros de la familia *Flaviviridae*. La relación entre los resultados obtenidos en este trabajo para el WNV y en otros estudios para el HCV, BVDV y CSFV se comentan a continuación.

La Ec-RNasa III y Dicer reconocen un tallo largo con un lazo interno en el WNV [M(458-517)]. Este tallo es procesado en las posiciones C471-C472 por la Ec-RNasa III, y G505-U506 por la Ec-RNasa III y Dicer. Los primeros 570 nucleótidos del HCV, que incluyen el IRES, también son reconocidos y procesados por la Ec-RNasa III: en la conformación cerrada del IRES de HCV se produce un corte que implica las posiciones C27 y U33, de la región situada entre el dominio I y II, y la posición G439 del dominio VI [Beguiristain *et al.*, 2005]; en su conformación abierta, el tallo-lazo VI (localizado entre las posiciones 428 y 508) es procesado por la Ec-RNasa III entre los nucleótidos G489-G490 [Diaz-Toledano *et al.*, 2009] (Fig. D.6).

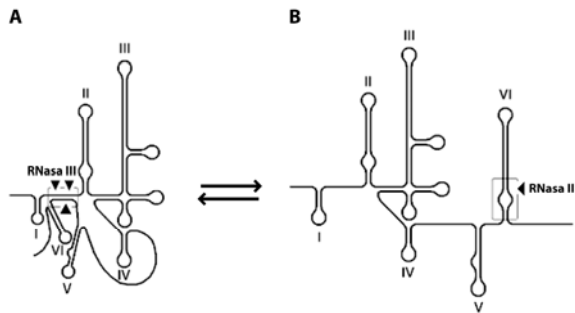


Fig. D.6.- Cortes producidos por la Ec-RNasa III en los primeros 570 nucleótidos del HCV. Mediante flechas se indican los cortes producidos por la Ec-RNasa III para los casos en los que el IRES se presenta en su conformación cerrada (A) o en su conformación abierta (B).

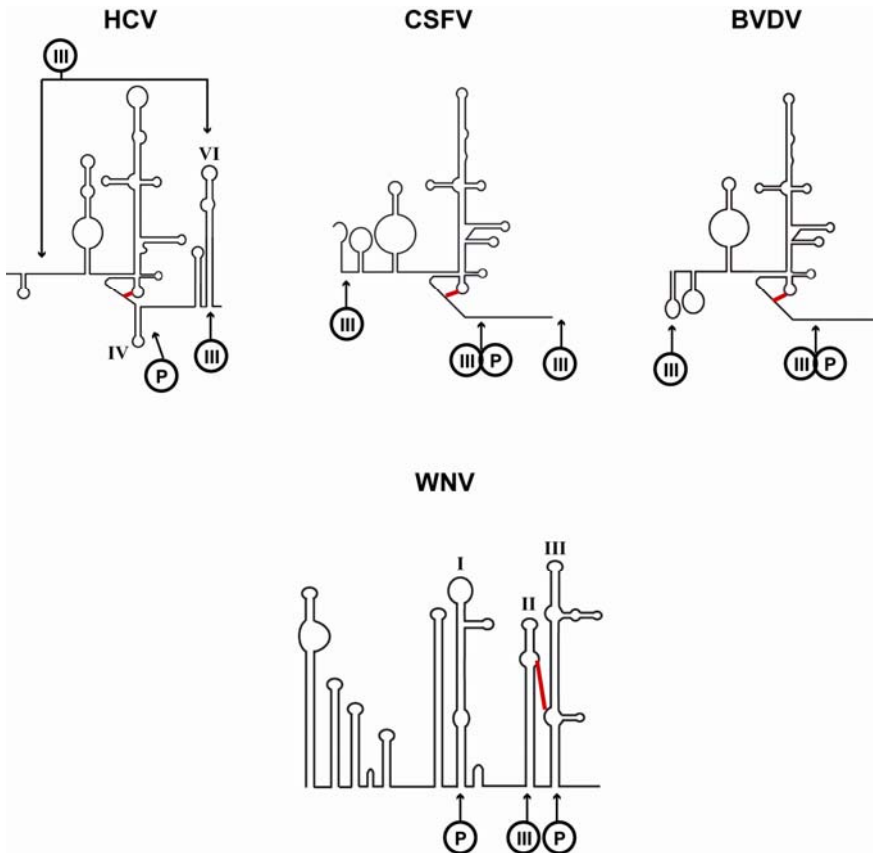
Además, otro estudio ha revelado que el dominio VI de HCV también puede ser reconocido y procesado en pequeños RNAs por la ribonucleasa humana Dicer *in vitro* [Ouellet *et al.*, 2009]. Llama la atención que tanto el motivo M(458-517) del WNV como el dominio VI del HCV, dos estructuras tipo tallo parecidas y localizadas aproximadamente en las mismas posiciones de dos RNAs virales diferentes, sean reconocidos *in vitro* por las mismas ribonucleasas.

Otros resultados no publicados, obtenidos en el laboratorio, muestran que algunos miembros del género *Pestivirus* también presentan estructuras reconocidas por la Ec-RNasa III *in vitro*. Estos motivos estructurales son procesados aproximadamente entre las posiciones 20 y 40, y las posiciones 370 y 400 en el BVDV; y alrededor de las posiciones 30, 360 y entre las posiciones 500 y 600 en el caso del CSFV.

La RNasa P ha permitido encontrar una estructura tipo tRNA en el IRES del HCV [Nadal *et al.*, 2002; Sabariego *et al.*, 2004] y en los IRES de CSFV y BVDV [Lyons and Robertson, 2003], localizada aproximadamente entre las posiciones 300 y 400. En el caso del WNV, los motivos estructurales M(274-393) y M(520-663) son reconocidos y procesados por la RNasa P. Y, al igual que para la estructura tipo tRNA del HCV, CSFV y BVDV [Lyons and Robertson, 2003], el motivo M(520-663) también contiene una estructura *pseudoknot*.

En la figura D.7 se muestra un esquema que resume el reconocimiento de las RNasas III y P en la organización estructural (Fig. D.7.A) y en la organización genómica (Fig. D.7.B) del WNV, HCV, BVDV y CSFV.

A



B

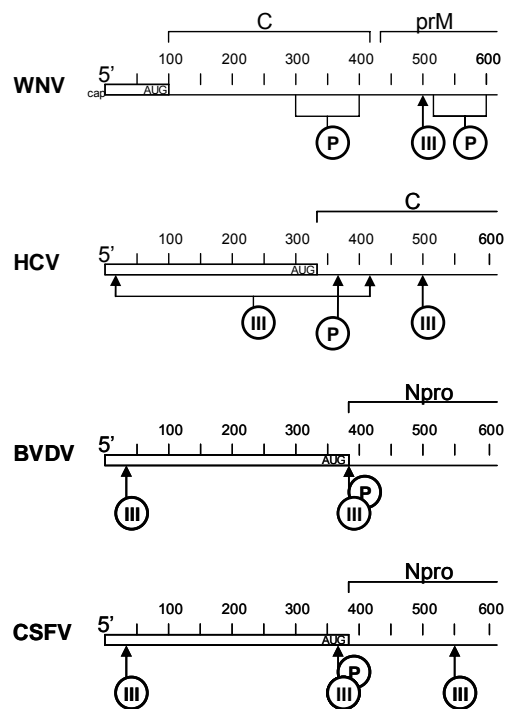
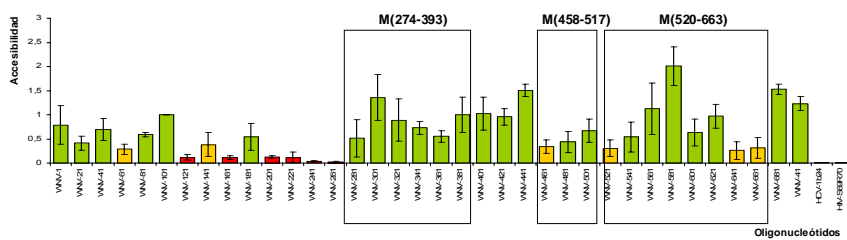


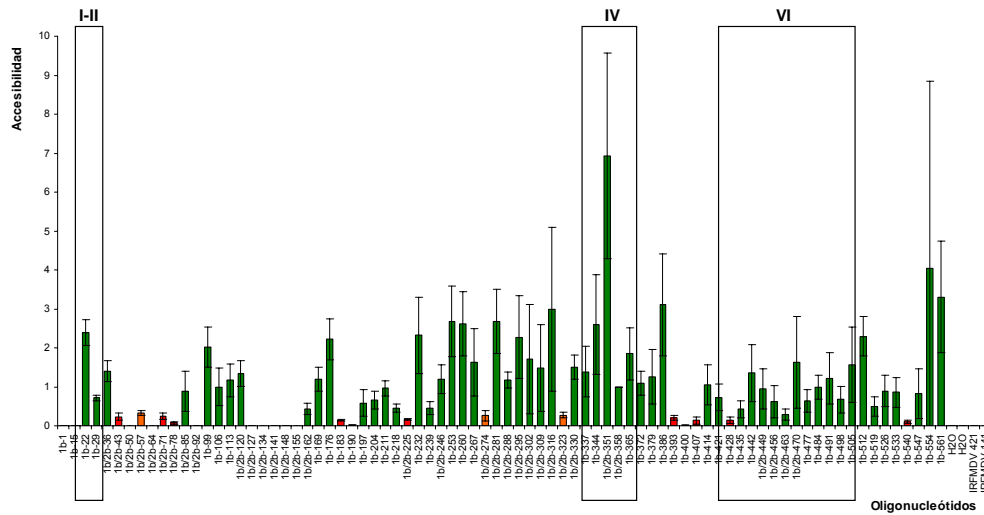
Fig. D.7.- Esquema que resume los motivos estructurales y posiciones reconocidas por las RNasas III y P en el WNV, HCV, BVDV y CSFV. (A) Se representa la organización estructural del extremo 5' para cada uno de estos virus y se indican mediante flechas los motivos estructurales reconocidos por las RNasas. Las interacciones implicadas en las estructuras *pseudoknots* se representan con una línea de color rojo. **(B)** Se representa la organización genómica del extremo 5' de cada uno de estos virus. Se indica el codón de inicio de la traducción AUG y las posiciones nucleotídicas aproximadas que corresponden a cada proteína codificada por esta región. Mediante flechas se señala la posición aproximada que reconocen las ribonucleasas. En ambas figuras las RNasas III y P se representan dentro de un círculo.

Tal y como se ha comentado anteriormente, los motivos estructurales del WNV reconocidos por las RNasas III y P se localizan en regiones de accesibilidad alta (Fig. D.8.A). Otros ensayos de hibridación a microarrays de DNA realizados para el HCV (C. Briones, resultados sin publicar) han mostrado que los motivos estructurales reconocidos por estas ribonucleasas están localizados también en regiones accesibles (Fig. D.8.B). Para el BVDV, los microarrays de DNA (J. Gómez, resultados sin publicar) han mostrado que la región de reconocimiento para la RNasa III entre los nucleótidos 20 y 40 es poco accesible, pero la reconocida entre las posiciones 370 y 400, situada en posiciones cercanas a las del WNV y HCV, es más accesible como en los otros virus. La región reconocida por la RNasa P en el BVDV también presenta una accesibilidad alta.

A) WNV



B) HCV



C) BVDV

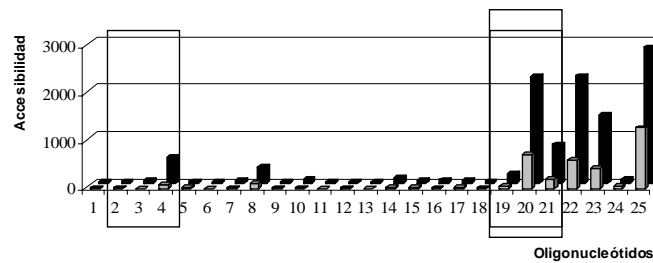


Fig. D.8.- Accesibilidad de las regiones reconocidas por las RNasas III y P en el extremo 5' del genoma del (A) WNV, (B) HCV y (C) BVDV. Se muestra la representación gráfica de la accesibilidad para cada oligonucleótido obtenida de los ensayos de hibridación a microarrays de DNA. Las regiones reconocidas por la RNasa III se muestran en color rosa y las regiones reconocidas por la RNasa P se muestran en color azul. (B) C. Briones, resultados sin publicar. (C) J. Gómez, resultados sin publicar.

El hecho de que los motivos estructurales reconocidos por las RNAsas III y P en los virus anteriores se localicen en regiones con una accesibilidad alta y a una distancia similar desde el extremo 5' del genoma, pero que a la vez no compartan homología de secuencia, indica que aunque probablemente estos motivos tienen un origen distinto, no se encuentran ahí por accidente. Aunque en este trabajo no se han llevado a cabo estudios destinados a averiguar si los motivos reconocidos en el WNV ejercen alguna función, es previsible pensar que la tengan y que la compartan con los motivos relacionados en los otros virus. Estos dominios podrían reclutar ciertas proteínas implicadas en los diferentes procesos del ciclo viral con dominios de unión a dsRNA (proteína PKR, RNA helicasa, etc) para el caso del motivo estructural M(458-517), o de reconocimiento de estructuras tipo tRNA (proteínas transportadoras del tRNA, factores de elongación, etc) en el caso de los motivos M(274-393) y M(520-663). En el trabajo publicado por Lyons y Robertson en el 2003 [*Lyons and Robertson, 2003*] se sugiere que los dominios tipo tRNA próximos al codón de inicio AUG pueden ser una característica general de los IRES. En el WNV, la presencia de estos motivos en una posición similar a la del HCV y pestivirus podría ser indicativo de la presencia de un antiguo IRES que se perdió en la evolución del genoma viral.

C.- CONCLUSIONES

1.- Se ha identificado un motivo estructural entre las posiciones 458 y 517 de los primeros 702 nucleótidos del genoma del WNV (RNA WNV 1-702) que es reconocido y procesado específicamente *in vitro* por la RNasa III de *Escherichia coli* (Ec-RNasa III) y la RNasa III eucariota Dicer. Este motivo estructural consiste en un tallo largo con un lazo interno donde la Ec-RNasa III produce dos cortes que se localizan entre las posiciones C471-C472 y G505-U506, y Dicer un corte entre G505-U506.

2.- El RNA de la RNasa P de la cianobacteria *Synechocystis* sp. (Rz6803) y la RNasa P purificada de células HeLa (RNasa P humana) reconocen y procesan específicamente *in vitro* un motivo estructural situado entre las posiciones 520 y 663 del RNA WNV 1-702. Este motivo presenta una estructura compleja formada por dos lazos internos y tres tallos-lazo. En este motivo se han determinado varios cortes para el Rz6803 entre las posiciones A610-U611, U645-G646, G517-A518, y U521-C522. Además, la RNasa P humana produce otros cortes entre las posiciones 274 y 393.

3.- El análisis realizado mediante ensayos de hibridación a microarrays de oligonucleótidos complementarios de DNA muestra diferentes regiones de accesibilidad en el RNA WNV 1-702. Los motivos estructurales reconocidos por las RNasas III y P se localizan en las regiones de mayor accesibilidad identificadas.

4.- Los motivos estructurales encontrados en el WNV, reconocidos y procesados por los miembros de la familia RNasa III y RNasa P, que se localizan entre las posiciones 400-500 y 300-400 respectivamente, se sitúan en posiciones coincidentes a las identificadas en otros virus de la misma familia en relación al primer nucleótido.

B.- BIBLIOGRAFÍA

- Altman, S., and L. Kirsebom (1999), Ribonuclease P, in *The RNA World*, edited by R. F. Gesteland, et al., pp. 351-380, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Bakonyi, T., et al. (2005), Novel flavivirus or new lineage of West Nile virus, central Europe, *Emerg Infect Dis*, 11(2), 225-231.
- Bardwell, J. C., et al. (1989), Autoregulation of RNase III operon by mRNA processing, *Embo J*, 8(11), 3401-3407.
- Bartkiewicz, M., et al. (1989), Identification and characterization of an RNA molecule that copurifies with RNase P activity from HeLa cells, *Genes Dev*, 3(4), 488-499.
- Beguiristain, N., et al. (2005), RNase III cleavage demonstrates a long range RNA: RNA duplex element flanking the hepatitis C virus internal ribosome entry site, *Nucleic Acids Res*, 33(16), 5250-5261.
- Bellaousov, S., and D. H. Mathews (2010), ProbKnot: fast prediction of RNA secondary structure including pseudoknots, *Rna*, 16(10), 1870-1880.
- Bernabeu-Wittel, M., et al. (2007), West Nile virus past infections in the general population of Southern Spain, *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 25(9), 561-565.
- Bernstein, E., et al. (2001), Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference, *Nature*, 409(6818), 363-366.
- Bevilacqua, P. C., et al. (1998), Binding of the protein kinase PKR to RNAs with secondary structure defects: role of the tandem A-G mismatch and noncontiguous helices, *Biochemistry*, 37(18), 6303-6316.
- Billy, E., et al. (2001), Specific interference with gene expression induced by long, double-stranded RNA in mouse embryonal teratocarcinoma cell lines, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(25), 14428-14433.
- Blaszczyk, J., et al. (2001), Crystallographic and modeling studies of RNase III suggest a mechanism for double-stranded RNA cleavage, *Structure*, 9(12), 1225-1236.
- Bofill, D., et al. (2006), Human West Nile virus infection, Catalonia, Spain, *Emerg Infect Dis*, 12(7), 1163-1164.
- Bondre, V. P., et al. (2007), West Nile virus isolates from India: evidence for a distinct genetic lineage, *J Gen Virol*, 88(Pt 3), 875-884.
- Brinton, M. A., et al. (1986), The 3'-nucleotides of flavivirus genomic RNA form a conserved secondary structure, *Virology*, 153(1), 113-121.
- Brown, J. W. (1999), The Ribonuclease P Database, *Nucleic Acids Res*, 27(1), 314.
- Burt, F. J., et al. (2002), Phylogenetic relationships of southern African West Nile virus isolates, *Emerg Infect Dis*, 8(8), 820-826.
- Cai, X., et al. (2005), Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus expresses an array of viral microRNAs in latently infected cells, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(15), 5570-5575.

- Calin-Jageman, I., and A. W. Nicholson (2003a), Mutational analysis of an RNA internal loop as a reactivity epitope for *Escherichia coli* ribonuclease III substrates, *Biochemistry*, *42*(17), 5025-5034.
- Calin-Jageman, I., and A. W. Nicholson (2003b), RNA structure-dependent uncoupling of substrate recognition and cleavage by *Escherichia coli* ribonuclease III, *Nucleic Acids Res*, *31*(9), 2381-2392.
- Calisher, C. H., and E. A. Gould (2003), Taxonomy of the virus family Flaviviridae, *Adv Virus Res*, *59*, 1-19.
- Circle, D. A., et al. (1997), Surprising specificity of PKR binding to delta agent genomic RNA, *Rna*, *3*(4), 438-448.
- Cleaves, G. R., and D. T. Dubin (1979), Methylation status of intracellular dengue type 2 40 S RNA, *Virology*, *96*(1), 159-165.
- Clyde, K., et al. (2008), The capsid-coding region hairpin element (cHP) is a critical determinant of dengue virus and West Nile virus RNA synthesis, *Virology*, *379*(2), 314-323.
- Cohen-Chalamish, S., et al. (2009), Dynamic refolding of IFN-gamma mRNA enables it to function as PKR activator and translation template, *Nat Chem Biol*, *5*(12), 896-903.
- Chakravarthy, S., et al. (2010), Substrate-specific kinetics of Dicer-catalyzed RNA processing, *J Mol Biol*, *404*(3), 392-402.
- Chang, G. J., et al. (2004), Recent advancement in flavivirus vaccine development, *Expert Rev Vaccines*, *3*(2), 199-220.
- Chang, J., et al. (2003), Resistance of human hepatitis delta virus RNAs to dicer activity, *J Virol*, *77*(22), 11910-11917.
- Chotkowski, H. L., et al. (2008), West Nile virus infection of *Drosophila melanogaster* induces a protective RNAi response, *Virology*, *377*(1), 197-206.
- Chu, J. J., and M. L. Ng (2004), Infectious entry of West Nile virus occurs through a clathrin-mediated endocytic pathway, *J Virol*, *78*(19), 10543-10555.
- Chu, P. W., and E. G. Westaway (1985), Replication strategy of Kunjin virus: evidence for recycling role of replicative form RNA as template in semiconservative and asymmetric replication, *Virology*, *140*(1), 68-79.
- Dauphin, G., et al. (2004), West Nile: worldwide current situation in animals and humans, *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, *27*(5), 343-355.
- Davis, W. G., et al. (2007), Interaction between the cellular protein eEF1A and the 3'-terminal stem-loop of West Nile virus genomic RNA facilitates viral minus-strand RNA synthesis, *J Virol*, *81*(18), 10172-10187.
- Diamond, M. S. (2009), Progress on the development of therapeutics against West Nile virus, *Antiviral Res*, *83*(3), 214-227.
- Diaz-Toledano, R., et al. (2009), In vitro characterization of a miR-122-sensitive double-helical switch element in the 5' region of hepatitis C virus RNA, *Nucleic Acids Res*, *37*(16), 5498-5510.
- Dong, H., et al. (2008), Terminal structures of West Nile virus genomic RNA and their interactions with viral NS5 protein, *Virology*, *381*(1), 123-135.
- Du, Q. S., et al. (2007), DCL4 targets Cucumber mosaic virus satellite RNA at novel secondary structures, *J Virol*, *81*(17), 9142-9151.
- Dunn, J. J. (1976), RNase III cleavage of single-stranded RNA. Effect of ionic strength on the fidelity of cleavage, *J Biol Chem*, *251*(12), 3807-3814.
- Dunn, J. J., and F. W. Studier (1983), Complete nucleotide sequence of bacteriophage T7 DNA and the locations of T7 genetic elements, *J Mol Biol*, *166*(4), 477-535.

- Eder, P. S., et al. (1997), Characterization of two scleroderma autoimmune antigens that copurify with human ribonuclease P, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(4), 1101-1106.
- Elbashir, S. M., et al. (2001), RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs, *Genes Dev*, 15(2), 188-200.
- Emmerth, S., et al. (2010), Nuclear retention of fission yeast dicer is a prerequisite for RNAi-mediated heterochromatin assembly, *Dev Cell*, 18(1), 102-113.
- England, T. E., and O. C. Uhlenbeck (1978), 3'-terminal labelling of RNA with T4 RNA ligase, *Nature*, 275(5680), 560-561.
- Esakova, O., and A. S. Krasilnikov (2010), Of proteins and RNA: the RNase P/MRP family, *Rna*, 16(9), 1725-1747.
- Eun, H.-M. (1996), Nucleases, in *Enzymology Primer for Recombinant DNA Technology*, edited, Academic Press, Inc., San Diego, CA.
- Fernandez, N., et al. (2011), Structural analysis provides insights into the modular organization of picornavirus IRES, *Virology*, 409(2), 251-261.
- Figuerola, J., et al. (2007), Prevalence of West Nile virus neutralizing antibodies in colonial aquatic birds in southern Spain, *Avian Pathol*, 36(3), 209-212.
- Franch, T., et al. (1999), Ribonuclease III processing of coaxially stacked RNA helices, *J Biol Chem*, 274(37), 26572-26578.
- Gobert, A., et al. (2010), A single Arabidopsis organellar protein has RNase P activity, *Nature structural & molecular biology*, 17(6), 740-744.
- Gross, G., and J. J. Dunn (1987), Structure of secondary cleavage sites of E. coli RNAaseIII in A3t RNA from bacteriophage T7, *Nucleic Acids Res*, 15(2), 431-442.
- Guerrier-Takada, C., et al. (1983), The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme, *Cell*, 35(3 Pt 2), 849-857.
- Guerrier-Takada, C., et al. (1989), Specific interactions in RNA enzyme-substrate complexes, *Science*, 246(4937), 1578-1584.
- Hammond, J. A., et al. (2009), Comparison and functional implications of the 3D architectures of viral tRNA-like structures, *Rna*, 15(2), 294-307.
- Hammond, S. M. (2005), Dicing and slicing: the core machinery of the RNA interference pathway, *FEBS Lett*, 579(26), 5822-5829.
- Hartmann, E., and R. K. Hartmann (2003), The enigma of ribonuclease P evolution, *Trends Genet*, 19(10), 561-569.
- Hayes, E. B., et al. (2005), Epidemiology and transmission dynamics of West Nile virus disease, *Emerg Infect Dis*, 11(8), 1167-1173.
- Heinicke, L. A., et al. (2009), RNA dimerization promotes PKR dimerization and activation, *J Mol Biol*, 390(2), 319-338.
- Higgs, S., et al. (2005), Nonviremic transmission of West Nile virus, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(25), 8871-8874.
- Hiraguri, A., et al. (2005), Specific interactions between Dicer-like proteins and HYL1/DRB-family dsRNA-binding proteins in Arabidopsis thaliana, *Plant Mol Biol*, 57(2), 173-188.
- Hofle, U., et al. (2008), West Nile virus in the endangered Spanish imperial eagle, *Vet Microbiol*, 129(1-2), 171-178.
- Holzmann, J., et al. (2008), RNase P without RNA: identification and functional reconstitution of the human mitochondrial tRNA processing enzyme, *Cell*, 135(3), 462-474.
- Hutvagner, G., et al. (2001), A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA, *Science*, 293(5531), 834-838.

- Jarrige, A. C., et al. (2001), PNPase autocontrols its expression by degrading a double-stranded structure in the pnp mRNA leader, *Embo J*, 20(23), 6845-6855.
- Jarrous, N., and S. Altman (2001), Human ribonuclease P, *Methods Enzymol*, 342, 93-100.
- Jarrous, N. (2002), Human ribonuclease P: subunits, function, and intranuclear localization, *Rna*, 8(1), 1-7.
- Jarrous, N., and R. Reiner (2007), Human RNase P: a tRNA-processing enzyme and transcription factor, *Nucleic Acids Res*, 35(11), 3519-3524.
- Jimenez-Clavero, M. A., et al. (2007), Serosurvey of West Nile virus in equids and bovids in Spain, *Vet Rec*, 161(6), 212.
- Jinek, M., and J. A. Doudna (2009), A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference, *Nature*, 457(7228), 405-412.
- Joshi, R. L., et al. (1986), Interaction of turnip yellow mosaic virus Val-RNA with eukaryotic elongation factor EF-1 [alpha]. Search for a function, *Embo J*, 5(6), 1143-1148.
- Kapoor, H., et al. (2004), Persistence of West Nile Virus (WNV) IgM antibodies in cerebrospinal fluid from patients with CNS disease, *J Clin Virol*, 31(4), 289-291.
- Kaptoul, D., et al. (2007), West Nile virus in Spain: report of the first diagnosed case (in Spain) in a human with aseptic meningitis, *Scand J Infect Dis*, 39(1), 70-71.
- Kikovska, E., et al. (2007), Eukaryotic RNase P RNA mediates cleavage in the absence of protein, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(7), 2062-2067.
- Knapp, G. (1989), Enzymatic Approaches to Probing of RNA Secondary and Tertiary Structure, in *Methods in Enzymology*, edited by J. E. Dahlberg and J. N. Abelson, pp. 192-212, Academic Press, Inc., San Diego.
- Kramer, L. D., et al. (2007), West Nile virus, *Lancet Neurol*, 6(2), 171-181.
- Kummerer, B. M., and C. M. Rice (2002), Mutations in the yellow fever virus nonstructural protein NS2A selectively block production of infectious particles, *J Virol*, 76(10), 4773-4784.
- Lamontagne, B., et al. (2001), The RNase III family: a conserved structure and expanding functions in eukaryotic dsRNA metabolism, *Curr Issues Mol Biol*, 3(4), 71-78.
- Lanciotti, R. S., et al. (1999), Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern United States, *Science*, 286(5448), 2333-2337.
- Leuschner, P. J., and J. Martinez (2007), In vitro analysis of microRNA processing using recombinant Dicer and cytoplasmic extracts of HeLa cells, *Methods (San Diego, Calif)*, 43(2), 105-109.
- Li, X. F., et al. (2010), RNA elements within the 5' untranslated region of the West Nile virus genome are critical for RNA synthesis and virus replication, *J Gen Virol*, 91(Pt 5), 1218-1223.
- Lindenbach, B. D., et al. (2007), Flaviviridae: the virus and their replication, in *Fields Virology*, edited by D. M. Knipe and P. M. Howley, pp. 1101-1152, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Litvak, S., et al. (1973), Elongation factor-viral genome interaction dependent on the aminoacylation of TYMV and TMV RNAs, *Nature: New biology*, 241(107), 88-90.
- Liu, W. J., et al. (2003), Molecular and functional analyses of Kunjin virus infectious cDNA clones demonstrate the essential roles for NS2A in virus assembly and for a nonconservative residue in NS3 in RNA replication, *J Virol*, 77(14), 7804-7813.

- Liu, W. J., et al. (2005), Inhibition of interferon signaling by the New York 99 strain and Kunjin subtype of West Nile virus involves blockage of STAT1 and STAT2 activation by nonstructural proteins, *J Virol*, 79(3), 1934-1942.
- Lvov, D. K., et al. (2004), West Nile virus and other zoonotic viruses in Russia: examples of emerging-reemerging situations, *Arch Virol Suppl*(18), 85-96.
- Lyons, A. J., and H. D. Robertson (2003), Detection of tRNA-like structure through RNase P cleavage of viral internal ribosome entry site RNAs near the AUG start triplet, *J Biol Chem*, 278(29), 26844-26850.
- Macrae, I. J., et al. (2006), Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer, *Science*, 311(5758), 195-198.
- MacRae, I. J., and J. A. Doudna (2007), Ribonuclease revisited: structural insights into ribonuclease III family enzymes, *Curr Opin Struct Biol*, 17(1), 138-145.
- MacRae, I. J., et al. (2007), Structural determinants of RNA recognition and cleavage by Dicer, *Nature structural & molecular biology*, 14(10), 934-940.
- Mann, H., et al. (2003), Eukaryotic RNase P: role of RNA and protein subunits of a primordial catalytic ribonucleoprotein in RNA-based catalysis, *Mol Cell*, 12(4), 925-935.
- Mans, R. M., et al. (1990), Interaction of RNase P from Escherichia coli with pseudoknotted structures in viral RNAs, *Nucleic Acids Res*, 18(12), 3479-3487.
- Martell, M., et al. (2004), Structural analysis of hepatitis C RNA genome using DNA microarrays, *Nucleic Acids Res*, 32(11), e90.
- Martin, D. A., et al. (2004), Evaluation of a diagnostic algorithm using immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assay to differentiate human West Nile Virus and St. Louis Encephalitis virus infections during the 2002 West Nile Virus epidemic in the United States, *Clin Diagn Lab Immunol*, 11(6), 1130-1133.
- Mathews, D. H., et al. (1999), Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure, *J Mol Biol*, 288(5), 911-940.
- Matsunaga, J., et al. (1996), RNase III autoregulation: structure and function of rncO, the posttranscriptional "operator", *Rna*, 2(12), 1228-1240.
- Matsunaga, J., et al. (1997), Escherichia coli RNase III (rnc) autoregulation occurs independently of rnc gene translation, *Mol Microbiol*, 26(5), 1125-1135.
- Mattijssen, S., et al. (2010), Viperin mRNA is a novel target for the human RNase MRP/RNase P endoribonuclease, *Cell Mol Life Sci*.
- Minke, J. M., et al. (2004), Recombinant canarypoxvirus vaccine carrying the prM/E genes of West Nile virus protects horses against a West Nile virus-mosquito challenge, *Arch Virol Suppl*(18), 221-230.
- Modis, Y., et al. (2004), Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion, *Nature*, 427(6972), 313-319.
- Molnar, A., et al. (2005), Plant virus-derived small interfering RNAs originate predominantly from highly structured single-stranded viral RNAs, *J Virol*, 79(12), 7812-7818.
- Mostashari, F., et al. (2001), Epidemic West Nile encephalitis, New York, 1999: results of a household-based seroepidemiological survey, *Lancet*, 358(9278), 261-264.
- Mukhopadhyay, S., et al. (2003), Structure of West Nile virus, *Science*, 302(5643), 248.
- Mukhopadhyay, S., et al. (2005), A structural perspective of the flavivirus life cycle, *Nat Rev Microbiol*, 3(1), 13-22.
- Munoz-Jordan, J. L., et al. (2003), Inhibition of interferon signaling by dengue virus, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(24), 14333-14338.

- Nadal, A., et al. (2002), Specific cleavage of hepatitis C virus RNA genome by human RNase P, *J Biol Chem*, 277(34), 30606-30613.
- Nakamura, Y. (2001), Molecular mimicry between protein and tRNA, *J Mol Evol*, 53(4-5), 282-289.
- Nicholson, A. W. (2003), The Ribonuclease III Superfamily: Forms and Functions in RNA Maturation, Decay, and Gene Silencing, in *RNAi: A GUIDE TO GENE SILENCING*, edited by G. J. Hannon, pp. 149-174, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.
- Niranjanakumari, S., et al. (1998), Protein component of the ribozyme ribonuclease P alters substrate recognition by directly contacting precursor tRNA, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(26), 15212-15217.
- Ooms, M., et al. (2004), Probing alternative foldings of the HIV-1 leader RNA by antisense oligonucleotide scanning arrays, *Nucleic Acids Res*, 32(2), 819-827.
- Ouellet, D. L., et al. (2008), Identification of functional microRNAs released through asymmetrical processing of HIV-1 TAR element, *Nucleic Acids Res*, 36(7), 2353-2365.
- Ouellet, D. L., et al. (2009), Refractoriness of hepatitis C virus internal ribosome entry site to processing by Dicer in vivo, *J Negat Results Biomed*, 8, 8.
- Panayotatos, N., and K. Truong (1985), Cleavage within an RNase III site can control mRNA stability and protein synthesis in vivo, *Nucleic Acids Res*, 13(7), 2227-2240.
- Pannucci, J. A., et al. (1999), RNase P RNAs from some Archaea are catalytically active, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(14), 7803-7808.
- Pascual, A., and A. Vioque (1996), Cloning, purification and characterization of the protein subunit of ribonuclease P from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, *European journal of biochemistry / FEBS*, 241(1), 17-24.
- Pascual, A., and A. Vioque (1999), Substrate binding and catalysis by ribonuclease P from cyanobacteria and *Escherichia coli* are affected differently by the 3' terminal CCA in tRNA precursors, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(12), 6672-6677.
- Pertzev, A. V., and A. W. Nicholson (2006), Characterization of RNA sequence determinants and antideterminants of processing reactivity for a minimal substrate of *Escherichia coli* ribonuclease III, *Nucleic Acids Res*, 34(13), 3708-3721.
- Pfeffer, S., et al. (2004), Identification of virus-encoded microRNAs, *Science*, 304(5671), 734-736.
- Pfeffer, S., et al. (2005), Identification of microRNAs of the herpesvirus family, *Nat Methods*, 2(4), 269-276.
- Pinck, M., et al. (1970), Enzymatic binding of valine to the 3' end of TYMV-RNA, *Nature*, 226(5249), 954-956.
- Pleij, C. W., and L. Bosch (1989), RNA pseudoknots: structure, detection, and prediction, in *Methods in Enzymology*, edited by J. E. Dahlberg and J. N. Abelson, pp. 289-303, Academic Press, Inc., San Diego.
- Prochiantz, A., and A. L. Haenni (1973), TYMV RNA as a substrate of tRNA maturation endonuclease, *Nature: New biology*, 241(110), 168-170.
- Provost, P., et al. (2002), Ribonuclease activity and RNA binding of recombinant human Dicer, *Embo J*, 21(21), 5864-5874.
- Reiner, R., et al. (2006), A role for the catalytic ribonucleoprotein RNase P in RNA polymerase III transcription, *Genes Dev*, 20(12), 1621-1635.

- Reiter, N. J., et al. (2010), Structure of a bacterial ribonuclease P holoenzyme in complex with tRNA, *Nature*, 468(7325), 784-789.
- Robertson, H. D., et al. (1967), A nuclease specific for double-stranded RNA, *Virology*, 32(4), 718-719.
- Robertson, H. D., et al. (1968), Purification and properties of ribonuclease III from *Escherichia coli*, *J Biol Chem*, 243(1), 82-91.
- Robertson, H. D., et al. (1972), Purification and properties of a specific *Escherichia coli* ribonuclease which cleaves a tyrosine transfer ribonucleic acid precursor, *J Biol Chem*, 247(16), 5243-5251.
- Robertson, H. D., and J. J. Dunn (1975), Ribonucleic acid processing activity of *Escherichia coli* ribonuclease III, *J Biol Chem*, 250(8), 3050-3056.
- Robertson, H. D. (1982), *Escherichia coli* ribonuclease III cleavage sites, *Cell*, 30(3), 669-672.
- Rossi, S. L., et al. (2010), West Nile virus, *Clin Lab Med*, 30(1), 47-65.
- Sabariego, R., et al. (2004), Catalytic RNase P RNA from *Synechocystis* sp. cleaves the hepatitis C virus RNA near the AUG start codon, *FEBS Lett*, 577(3), 517-522.
- Serrano, P., et al. (2007), Characterization of a cyanobacterial RNase P ribozyme recognition motif in the IRES of foot-and-mouth disease virus reveals a unique structural element, *Rna*, 13(6), 849-859.
- Shi, P. Y., et al. (1996), Evidence for the existence of a pseudoknot structure at the 3' terminus of the flavivirus genomic RNA, *Biochemistry*, 35(13), 4222-4230.
- Silber, R., et al. (1972), Purification and properties of bacteriophage T4-induced RNA ligase, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 69(10), 3009-3013.
- Smithburn, K. C., et al. (1940), A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda, *Am J Trop Med Hyg*, 20, 471-492.
- Springer, M., et al. (1998), RNA Mimicry in the Translational Apparatus, in *RNA Structure and Function*, edited by R. W. Simons, pp. 377-413, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Srivastava, A. K., and D. Schlessinger (1990), Mechanism and regulation of bacterial ribosomal RNA processing, *Annu Rev Microbiol*, 44, 105-129.
- Thomas, B. C., et al. (2000), Chloroplast ribonuclease P does not utilize the ribozyme-type pre-tRNA cleavage mechanism, *Rna*, 6(4), 545-553.
- Toroney, R., et al. (2010), Regulation of PKR by HCV IRES RNA: importance of domain II and NS5A, *J Mol Biol*, 400(3), 393-412.
- Tous, C., et al. (2001), Conditional expression of RNase P in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 allows detection of precursor RNAs. Insight in the in vivo maturation pathway of transfer and other stable RNAs, *J Biol Chem*, 276(31), 29059-29066.
- Tsonis, P. A., and B. Dwivedi (2008), Molecular mimicry: structural camouflage of proteins and nucleic acids, *Biochimica et biophysica acta*, 1783(2), 177-187.
- Vioque, A. (1992), Analysis of the gene encoding the RNA subunit of ribonuclease P from cyanobacteria, *Nucleic Acids Res*, 20(23), 6331-6337.
- Vioque, A., and S. Altman (2001), Ribonuclease P, in *RNA*, edited by D. Söll, et al., pp. 137-154, Pergamon, Oxford.
- Walker, S. C., and D. R. Engelke (2006), Ribonuclease P: the evolution of an ancient RNA enzyme, *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 41(2), 77-102.

- Wengler, G. (1981), Terminal sequences of the genome and replicative-form RNA of the flavivirus West Nile virus: absence of poly(A) and possible role in RNA replication, *Virology*, *113*(2), 544-555.
- Wickner, R. B. (2007), Viruses and Prions of Yeasts, Fungi, and Unicellular Organisms, in *Fields Virology*, edited by D. M. Knipe and P. M. Howley, pp. 737-768, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Wilusz, J. E., et al. (2008), 3' end processing of a long nuclear-retained noncoding RNA yields a tRNA-like cytoplasmic RNA, *Cell*, *135*(5), 919-932.
- Xie, Z., et al. (2004), Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants, *PLoS Biol*, *2*(5), E104.
- Yot, P., et al. (1970), Valine-specific tRNA-like structure in turnip yellow mosaic virus RNA, *Proc Natl Acad Sci U S A*, *67*(3), 1345-1352.
- Zhang, B., et al. (2008), West Nile virus genome cyclization and RNA replication require two pairs of long-distance RNA interactions, *Virology*, *373*(1), 1-13.
- Zhang, B., et al. (2010), Genetic analysis of West Nile virus containing a complete 3'CSI RNA deletion, *Virology*, *408*(2), 138-145.
- Zhang, H., et al. (2002), Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP, *Embo J*, *21*(21), 5875-5885.
- Zhang, H., et al. (2004), Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III, *Cell*, *118*(1), 57-68.
- Zhang, K., and A. W. Nicholson (1997), Regulation of ribonuclease III processing by double-helical sequence antideterminants, *Proc Natl Acad Sci U S A*, *94*(25), 13437-13441.
- Zhang, W., et al. (2009), Rapid and accurate in vitro assays for detection of West Nile virus in blood and tissues, *Transfus Med Rev*, *23*(2), 146-154.
- Zuker, M. (2003), Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction, *Nucleic Acids Res*, *31*(13), 3406-3415.