

03072
1



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA



Obtención y caracterización de mezclas
fenotípicas de rotavirus

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA

P R E S E N T A

GUILLERMO PERALES ORTIZ

2004

Cuernavaca, Mor. 2001

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se realizo en el Instituto de Biotecnología de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Carlos F. Arias Ortíz.

Miembros del comité tutorial

Dr. Carlos F. Arias Ortíz
Dr. Edmundo Calva Mercado
Dr. Joaquín Sánchez Castillo

Miembros del Jurado de Exámen

Dr. José Luis Puente García
Dr. Carlos Arias Ortíz
Dr. Celso Ramos García
Dr. Ernesto Mendez Salinas
Dr. Fernando Esquivel Guadarrama

Contenido	Página
Introducción	
Generalidades	1
Clasificación	1
Proteínas virales	2
Ciclo de replicación de rotavirus	3
Virus rearreglantes	6
Planteamiento del problema	7
Objetivo	9
Objetivos particulares	11
Metodología	
Purificación de plásmidos	12
Ensayo de sensibilidad a lipofectina	13
Ensayo para titular lisados de rotavirus	13
Producción de stock de vaccinia vTF7-3	14
Ensayo en placa para titular al virus vaccinia vTF7-3	15
Protocolo de coinfección de rotavirus y vaccinia vTF7-3	16
Expresión de proteínas en células MA104	16
Ensayo de inmunoprecipitación de proteínas	17
Ensayo de expresión del receptor de laminina con el sistema de vaccinia en presencia de rotavirus	18
Ensayo para obtención de mezclas fenotípicas	18
Ensayo de neutralización de anticuerpos	19
Ensayo de sensibilidad a neuraminidasa	19
Ensayos para determinación de termosensibilidad	19
Resultados	
Expresión de proteínas con el virus vaccinia vTF7-3	20
Eficiencia de transfección	21
Ensayos de coinfección de rotavirus y vaccinia vTF7-3	23
Expresión del receptor de laminina con vaccinia vTF7-3 en presencia de rotavirus	25
Ensayos de neutralización	27
Sensibilidad a neuraminidasa	29
Rescate de mutantes termosensibles mediante mezclas fenotípicas	31
Discusión	34
Bibliografía	39

Resumen

En este trabajo se propone una estrategia para incorporar proteínas VP4 heterólogas dentro de partículas maduras de rotavirus. La proteína VP4 heteróloga proviene de una cepa de rotavirus diferente a la cepa aceptora, y el gene que la codifica está clonado en un vector de expresión compatible con el sistema de expresión de vaccinia recombinante. Células MA104 son infectadas con vaccinia recombinante y transfectadas con el plásmido que acarrea el gene de VP4 heterólogo; al cabo de unas horas se expresa la proteína VP4 y las células son infectadas con la cepa aceptora de rotavirus, con la intención de que durante el ciclo de infección de rotavirus, al ser ensambladas las partículas, las proteínas VP4 heterólogas se incorporen dentro de las partículas virales infecciosas de la progenie, dando lugar a mezclas fenotípicas. Se obtuvieron evidencias que sugieren la presencia de la proteína VP4 heteróloga dentro de partículas infecciosas de la progenie, utilizando ensayos de neutralización de la infección con anticuerpos monoclonales específicos y ensayos de sensibilidad a neuraminidasa. Además, los resultados con ensayos de rescate de mutantes termosensibles en VP4 demuestran que es posible obtener partículas de rotavirus que contengan una proteína heteróloga expresada a partir de un gene clonado.

INTRODUCCIÓN

Los rotavirus son un agente etiológico de gastroenteritis y se han asociado principalmente al desarrollo de diarreas severas en recién nacidos y jóvenes, tanto humanos como animales, en todo el mundo. Los efectos causados por la infección de rotavirus son más evidentes en países menos desarrollados donde llegan a constituir una causa importante de mortalidad entre la población infantil (Guerrant *et al*, 1990).

Los rotavirus constituyen un género dentro de la familia Reoviridae. Las partículas virales maduras miden aproximadamente 75 nm de diámetro, están estructuradas por tres capas concéntricas de proteína con simetría icosaédrica y no tienen una bicapa de lípidos. El genoma consiste de 11 segmentos de RNA de doble cadena (dsRNA), donde cada segmento codifica al menos para una proteína (Estes *et al*, 1996).

Clasificación

De acuerdo a sus características inmunológicas los rotavirus se clasifican en grupos, subgrupos y serotipos. Dentro de cada grupo se incluyen virus que comparten antígenos responsables de reacción cruzada, detectables por pruebas serológicas como inmunofluorescencia, ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA) e inmunomicroscopía electrónica. Asimismo, virus de diferentes grupos comparten características morfológicas y bioquímicas, pero no cruzan inmunológicamente en las pruebas antes mencionadas.

Se han descrito seis grupos de rotavirus (A al F). Los grupos A, B y C incluyen rotavirus aislados tanto de humanos como de animales, mientras que los grupos, D, E y F incluyen sólo rotavirus aislados de animales. Los rotavirus del grupo A han sido más estudiados, en buena medida, porque se cuenta con cepas adaptadas a crecer en condiciones de laboratorio y en general atraen mayor interés por su importancia médica ya que infectan a humanos, y animales de importancia económica, como bovinos, cerdos, caballos, etc.

La proteína VP6 contiene un epítopo que es el principal determinante de la reactividad antigénica del grupo A. Además, esta proteína tiene otro epítopo característico de subgrupo que se utiliza para clasificar los rotavirus del grupo A en los subgrupos I y II (Kapikian *et al*, 1996).

De acuerdo al nivel de reactividad que manifiesta cada cepa al someterse a un ensayo de neutralización, utilizando sueros hiperinmunes heterólogos (producidos contra cepas diferentes a la ensayada) y homólogos (producido contra la misma cepa), se ha clasificado a los rotavirus en serotipos llamados G y P basados en la reactividad de las proteínas de superficie VP7 y VP4, respectivamente (Estes, 1996; Kapikian *et al*, 1996).

Proteínas virales

El peso molecular de las proteínas codificadas por el genoma de los rotavirus varía de 20 a 125 KDa. De las 12 proteínas virales (el segmento 11 de RNA codifica para 2 proteínas), seis están presentes en el virión maduro y se denominan VP de acuerdo a las siglas en inglés “viral protein”. Las proteínas VP1, VP2 y VP3 forman parte del core, mientras que VP6 forma la capa intermedia. VP4 y VP7 forman la capa externa del virus. Las 6 proteínas restantes no son estructurales y se denominan NSP1 a NSP6, por las siglas en inglés para “non structural protein”. Estas proteínas están involucradas en los procesos de replicación y maduración viral (Mattion *et al*, 1994).

El conocimiento de la estructura y función de las proteínas de la capa externa, así como el estudio de sus interacciones dentro del virus, es fundamental para entender los mecanismos básicos de reconocimiento, activación y penetración a la célula huésped. Esto nos ofrece, además, nuevas alternativas para el diseño de estrategias para prevenir la infección por estos virus.

La proteína VP4 es codificada por el segmento genómico número 4. En la mayoría de cepas aisladas de origen humano, VP4 contiene 775 aminoácidos. En las cepas de origen animal VP4 tiene 776 (Estes, 1996). El peso molecular promedio de VP4 es de 88 KDa y representa el 1.5% de la masa del virus. La proteína VP4 se encuentra en forma de dímeros, los cuales constituyen cada una de las 60 espículas características de la superficie viral (Prasad *et al*, 1990).

Además de su contribución como componente estructural de la partícula viral, la proteína VP4 tiene características funcionales esenciales para los rotavirus (ver adelante). En presencia de tripsina, VP4 es cortada específicamente en los residuos 231, 241 y 247, dando lugar a los polipéptidos VP5 (extremo COOH) y VP8 (extremo NH₂). Estos cortes producen un incremento de hasta mil veces en la infectividad del virus.

La proteína VP7, de 326 aa, está glicosilada y forma la capa de proteína más externa del virus, a partir de la cual se proyectan las espículas de VP4. La función de VP7 en la entrada del virus no es clara, pero podría estar involucrada en interactuar con receptores virales en algún paso posterior a la unión inicial del virus a la superficie celular.

Ciclo de Replicación de los Rotavirus

El ciclo replicativo del virus puede ser dividido para su estudio en: unión a la célula, penetración, transcripción, replicación, ensamble y liberación.

Sólo partículas con las tres capas protéicas, y que contengan VP4, son capaces de unirse a la célula huésped. Cada vez hay más evidencias que indican que el pegado de rotavirus ocurre vía VP4, aunque el proceso de entrada podría involucrar la función tanto de VP4 como de VP7.

Las cepas de rotavirus de origen humano y de origen animal difieren en sus requerimientos para unirse y penetrar a células MA104 en cultivo. Esta línea celular derivada de epitelio renal de mono Rhesus, es la más susceptible a la infección por rotavirus. Las cepas de origen animal necesitan, para ser infectivas, la presencia en la superficie celular de moléculas que contengan ácido siálico. La infectividad de las cepas silvestres de origen animal es inhibida cuando se trata a la célula huésped con neuraminidasa, enzima que corta específicamente residuos de ácido siálico. La infectividad también disminuye cuando se preincuba el virus con glicoforina, una glicoproteína de eritrocitos que contiene numerosos residuos de ácido siálico que compiten con las proteínas de la superficie celular por el pegado al virus (Fukudome *et al*, 1989).

Por otro lado la infectividad de las cepas de rotavirus aisladas de humanos no disminuye en presencia de glicoforina, ni por el tratamiento previo de las células con neuraminidasa, lo que indica que estas cepas no requieren interactuar con moléculas que contengan ácido siálico para infectar. Esto, a su vez, está apoyado por el hecho de que las cepas de origen animal, y no las de origen humano, son capaces de aglutinar eritrocitos (hemaglutinación), a través de interactuar con residuos de ácido siálico en la superficie de estas células. Tanto la sensibilidad a glicoforina y a neuraminidasa, como la capacidad de hemaglutinación son características conferidas por la proteína VP4, sobre la cual se ha mapeado la región entre el aminoácido 93 y el 208, dentro del dominio VP8, que es suficiente para determinar la actividad de hemaglutinación, y en particular los residuos de tyr155, tyr188 y ser190 parecen ser relevantes. De manera general se puede establecer que las diferencias entre cepas de origen animal y de origen humano, en cuanto a requerimiento de ácido siálico, se pueden reducir a diferencias en la proteína VP4 (Fuentes Pananá, *et al* 1995; Isa, *et al* 1997).

Para conocer que región de la proteína VP4 interacciona con la célula huésped se han utilizado anticuerpos monoclonales dirigidos contra VP4 que inhiben la infectividad de cepas de rotavirus que requieren de ácido siálico. Se ha reportado que los anticuerpos dirigidos contra VP8 previenen el pegado a células MA104 del virus, mientras que los anticuerpos dirigidos contra VP5 no tienen este efecto (Ruggeri *et al*, 1991). Estos resultados indican que los rotavirus dependientes de ácido siálico se unen a la superficie celular a través del dominio VP8 de la proteína VP4. Sin embargo, en la cepa mutante de rotavirus animal nar3, cuya infectividad no es afectada por neuraminidasa, ya que no requieren de la presencia de ácido siálico para infectar (Méndez *et al*, 1993), los anticuerpos dirigidos contra el dominio VP5 inhiben el pegado a la célula, mientras que anticuerpos contra VP8 no lo hacen (Mendez *et al*, 1993; Zarate *et al*, 2000). Esta observación, mas el hecho de que glicoforina se une al virus nar3 pero no inhibe la infectividad, llevó a la propuesta de que en la cepa mutante nar3 queda al descubierto un segundo dominio localizado en VP5 (independiente de ácido siálico), que puede mediar la unión a la célula huésped a través de un segundo coreceptor resistente a neuraminidasa.

Estudios recientes indican que la molécula de integrina $\alpha 2\beta 1$ es utilizada como sitio de unión inicial a la célula por la cepa nar3, y además también es utilizada como segundo receptor por la cepa de origen animal RRV, en un evento posterior a la unión al receptor que contiene ácido siálico. Además, se ha mostrado que la integrina $\alpha V\beta 3$ y la proteína hsc70 también son utilizadas como coreceptores tanto por la cepa de rotavirus Wa de origen humano, por la cepa RRV de origen animal, e incluso por la cepa mutante nar3 en algún paso posterior al pegado inicial. Lo anterior indica que el evento de unión y penetración a la célula huésped está dividido en varios pasos subsecuentes y se ha propuesto que el receptor para rotavirus posiblemente sea un complejo de varias moléculas que forman parte de micro dominios ("rafts") sobre la membrana celular (Arias *et al*, 2001; Guerrero *et al*, 2000).

No se conoce con precisión el mecanismo o los eventos requeridos para que los rotavirus entren a la célula huésped. Se ha reportado que entre 0° y 4° C los virus se unen a la superficie celular, pero no penetran al citoplasma. También se sabe que para que los virus penetren requieren ser pretratados con tripsina, ya que los virus que tienen una VP4 íntegra, es decir no cortada en VP8 y VP5, se unen a la célula pero no infectan. Se ha propuesto que la entrada del virus a la célula se lleva a cabo por penetración directa a nivel de la membrana plasmática, sin embargo, no se ha descartado totalmente el ingreso del virus por endocitosis (Kaijot *et al*, 1988 y Kantharidis *et al*, 1987).

Después de que el virus ha ingresado a la célula, el siguiente paso del ciclo de replicación viral consiste en la pérdida de la capa externa de la partícula infectante, dando origen a una subpartícula viral con actividad de transcryptasa. La RNA polimerasa dependiente de RNA se activa y sintetiza RNAs mensajeros virales, utilizando como templado la cadena negativa de cada segmento genómico. Estos mRNAs son traducidos por la maquinaria de la célula huésped y dan origen a las proteínas necesarias en el ciclo de replicación y para el ensamble del virus. Las glicoproteínas VP7 y NSP4, son sintetizadas por ribosomas asociados a la membrana del retículo endoplásmico, y son insertadas en la membrana del retículo endoplásmico debido a las secuencias señal del extremo amino, todas las demás proteínas virales son traducidas

por ribosomas libres. La acumulación de proteínas virales en el citoplasma resulta en la formación de una estructura de inclusión llamada viroplasma, en donde se ha propuesto que ocurre la replicación del genoma e inicia el ensamble de la progenie de viriones. Se desconoce de que manera ocurre la segregación de cada uno de los segmentos genómicos en las partículas. El resultado es que se asocian 11 diferentes mRNAs, cada uno representando un segmento genómico, con proteínas virales recién sintetizadas, suficientes para formar una subpartícula viral con actividad de replicasa. La enzima RNA polimerasa dependiente de RNA, utiliza como templado a los mRNAs y sintetiza una cadena negativa de RNA, resultando en la formación de segmentos de RNA de doble cadena. Las proteínas VP4 y VP6 han sido localizadas en el espacio que queda entre el viroplasma y el retículo endoplásmico, se ha propuesto que las partículas que salen del viroplasma adquieren la proteína VP6 para conformar la capa protéica intermedia. Se desconoce el mecanismo por el cual se adiciona la proteína VP4, hay estudios que muestran que las proteínas VP7, VP4 y NSP4 pueden estar asociadas, incluso formando estructuras oligoméricas (Gonzalez *et al* 2000). Se sabe que NSP4 funciona como receptor de las partículas virales que provienen del viroplasma, mediante la unión a la proteína VP6. Esta interacción permite que las partículas gemen hacia el lumen del retículo endoplásmico, adquiriendo durante este proceso las proteínas VP7 y VP4. Como resultado de la gemación las partículas virales en formación quedan temporalmente rodeadas por una membrana lipídica. Las proteínas VP7 y VP4 se condensan y se ensamblan para producir la cubierta externa de los rotavirus y la membrana lipídica se pierde. Finalmente, las partículas maduras no son envueltas y salen de la célula mediante lisis celular. (Patton *et al*, 1994).

Virus rearreglantes

Una característica única de los virus con genoma segmentado es la capacidad de intercambiar segmentos genómicos entre dos cepas diferentes, cuando éstas coinfectan una misma célula. Los virus que contienen segmentos derivados de las dos cepas infectantes se denominan rearreglantes. En la progenie viral de una coinfección, además de encontrar partículas virales representantes de ambas cepas padres, se

pueden distinguir genotípica y fenotípicamente varios tipos de partículas rearreglantes, que pueden o no ser estables, y que se pueden subcultivar *in vitro*.

En la progenie viral resultante de una coinfección con dos cepas diferentes, la capsida de cada partícula viral no necesariamente está formada por proteínas codificadas por el genoma encapsulado. Es decir, la coinfección con virus de diferentes cepas resulta en la formación de mezclas fenotípicas que se pueden denominar mosaicos, ya que las proteínas de la cápsida de una partícula viral pueden provenir de ambas cepas parentales. Evidentemente, las mezclas fenotípicas que no tengan su respaldo genotípico se perderán en la siguiente generación de partículas virales (Ward *et al.* 1988). Los virus rearreglantes se han utilizado para una amplia variedad de estudios y han sido de gran utilidad en el asignamiento de funciones de diferentes proteínas virales puesto que permiten observar la función de una proteína específica en un fondo genético diferente. Sin embargo, esta estrategia tiene limitaciones importantes por la dificultad en el método de selección de rearreglantes, además de que este tipo de virus sólo nos permiten estudiar las proteínas silvestres, esto es, no se pueden manipular genéticamente.

Otras estrategias que tradicionalmente se han utilizado para el estudio de proteínas de rotavirus son los ensayos de transcapsidación (Chen *et al.*, 1993); la obtención de mutantes letales condicionales (Gombold *et al.*, 1987); mutantes que escapan a la neutralización con anticuerpos monoclonales (Shaw *et al.*, 1986); mutantes con sensibilidad alterada a neuraminidasa y a glicoforina (Mendez *et al.*, 1993); y la clonación, expresión y mapeo de dominios involucrados en funciones determinadas (Fuentes Pananá *et al.*, 1995, Isa *et al.*, 1997).

Planteamiento del problema

Actualmente no hay un sistema para hacer genética reversa en rotavirus que permita, a través de modificar la información genética del virus, alterar la estructura o secuencia de las proteínas, incorporarlas a una partícula viral infecciosa y preguntar cuáles son las repercusiones funcionales y estructurales de tales cambios. Son varios los enfoques experimentales en exploración que pretenden resolver este problema:

- 1) El desarrollo de un sistema de replicación *in vitro* que dependa de un templado exógeno de RNA de cadena sencilla, que permita producir dsRNA y empacarlo adecuadamente para producir partículas infecciosas. El enfoque de estos trabajos consiste en manipular partículas subvirales con actividad de replicasa para que un segmento de RNA de doble cadena, recién sintetizado, pueda ser incorporado a estas subpartículas virales. Las partículas así obtenidas pueden ser manipuladas mediante las técnicas de transcapsidación *in vitro*, para recuperar partículas virales infecciosas susceptibles de ser estudiadas (Chen *et al*, 1993; Ramig *et al*, 1997).
- 2) Ensayos de coexpresión en células eucariotas de genes virales clonados, en condiciones que permitan la producción de pseudopartículas virales (carecientes de genoma). Ya se cuenta con un sistema de expresión en baculovirus en el que se expresan cuatro genes estructurales y es posible recuperar pseudopartículas virales susceptibles de ser analizadas mediante ensayos con anticuerpos específicos y su capacidad de unión a las células huésped (Crawford *et al*, 1994, Gilbert *et al*, 1997).
- 3) Síntesis de RNA viral de rotavirus a partir de un plásmido en presencia de un virus ayudador (Gorziglia *et al*, 1992). Se han construido cDNAs que codifican para la cadena positiva de un gene reportero flanqueado con los extremos 3' y 5' característicos de los genes de rotavirus. Cuando se transfecta este cDNA en presencia de un virus ayudador se logra amplificar el gene y expresar esta proteína, sin embargo, no se ha detectado la incorporación del dsRNA del reportero en partículas infecciosas de rotavirus.
- 4) Rescate de un mRNA viral, transfectado en células infectadas con rotavirus, en partículas virales infecciosas (Ramig, 1997). Con este enfoque se pretende construir un mRNA que contenga las señales 3' y 5' necesarios para ser reconocido

como propio por la maquinaria de replicación de rotavirus y eventualmente pueda ser incorporado como parte del genoma en partículas virales infecciosas.

- 5) Expresión en células de genes virales clonados, en presencia de partículas virales infectivas, en condiciones que permitan la incorporación de la proteína heteróloga a las partículas virales de la progenie durante la infección.

Esta última línea de investigación es la que se propone en el presente trabajo por lo que el objetivo que se plantea es:

Objetivo:

Desarrollar un método que permita sintetizar una proteína de rotavirus a partir del gene clonado en un plásmido, e incorporar esta proteína heteróloga a partículas virales maduras.

Para cumplir el objetivo se utilizó el sistema de expresión transitoria de proteínas basado en el virus recombinante de Vaccinia, que destaca por ser una herramienta muy versátil y tener una alta eficiencia de expresión de proteínas heterólogas. Entre otras ventajas, el virus vaccinia tiene un rango amplio de hospedero y puede infectar una gran variedad de tipos celulares de vertebrados e invertebrados. Además, el virus vaccinia transcribe y replica su DNA en el citoplasma con relativa independencia del núcleo celular (Miner, 1990).

Moss y colaboradores desarrollaron un sistema híbrido que aprovecha las cualidades de vaccinia y las ventajas de la RNA polimerasa del bacteriofago T7, que es una enzima utilizada ampliamente en sistemas de expresión en procariotes. La RNA polimerasa T7 es monomérica, con alta actividad catalítica y estricta especificidad de promotor. Este sistema híbrido consiste en un virus vaccinia recombinante que expresa altas cantidades de la RNA polimerasa T7 en las células infectadas; el sistema se complementa con la transfección de un plásmido que lleva codificado el gen de una

proteína de interés, bajo el control del promotor para la RNA polimerasa T7. De esta manera, la RNA polimerasa T7 transcribe el gen de interés para la posterior síntesis de la proteína por la maquinaria de traducción de la célula hospedera (Fuerst *et al*, 1986). Con este sistema ya se han expresado proteínas de rotavirus en las líneas celulares BSC40, CV1 y MA104 (Taylor *et al*, 1992; Offit *et al*, 1994; Hua *et al*, 1994; González *et al*, 1995; Newton *et al*, 1997; Affranchino *et al*, 1997).

La estrategia que se plantea en este trabajo es infectar con una cepa de rotavirus ya sea de origen animal o humano, células que estén expresando con el sistema de expresión de vaccinia, la proteína VP4 de una cepa de origen diferente, y posteriormente analizar la progenie para detectar la presencia de posibles mezclas fenotípicas, es decir partículas de rotavirus que hayan incorporado la VP4 de origen heterólogo.

El uso de la proteína VP4 para explorar y establecer condiciones en este sistema facilita el análisis de las mezclas fenotípicas porque esta proteína le confiere diferencias funcionales a las cepas de origen humano y animal.

Proponemos utilizar la cepa de rotavirus SA11 TsA778, de origen animal, como aceptor de proteínas VP4 heterólogas. Esta es una cepa mutante termosensible, ya que su infectividad a 39°C se reduce notablemente en relación con la infectividad a 31°C (Ramig, 1991). La alteración en esta cepa mutante ha sido mapeada en la proteína VP4 (Gombold, 1987). Proponemos infectar con este rotavirus mutante a las células que expresen la proteína VP4 de otra cepa de rotavirus, ya sea de origen animal o de origen humano. Posteriormente, analizar entre la progenie aquellas partículas que pierdan la termosensibilidad, esperando que las partículas maduras puedan incorporar la proteína VP4 expresada por el sistema vaccinia-T7 RNA polimerasa, y que ésta restablezca la capacidad de infectar igual en ambas temperaturas.

Objetivos particulares:

- 1) Caracterizar la producción de las proteínas VP4 de las cepas de rotavirus KU, de origen humano, y de YM, de origen porcino, en la línea celular MA104, utilizando el sistema de expresión de vaccinia y la RNA polimerasa T7.
- 2) Analizar la producción de rotavirus en células MA104 en presencia del virus vaccinia.
- 3) Caracterizar la producción de una proteína control (receptor de laminina) utilizando el sistema de expresión de vaccinia-RNA polimerasa T7, en presencia de rotavirus.
- 4) Infectar con rotavirus a células que expresan una proteína VP4 heteróloga (mediante el sistema de vaccinia-RNA polimerasa T7), y estudiar la progenie producida mediante ensayos de neutralización, sensibilidad a neuraminidasa y modificación de termosensibilidad, en busca de mezclas fenotípicas.

METODOLÓGÍA

En este proyecto se utilizaron las cepas de rotavirus YM de origen porcino, Wa de origen humano y la cepa mutante termosensible SA11 TsA778. Se utilizaron las líneas celulares MA 104, para replicación de las cepas de rotavirus y BSC40 para la replicación del virus vaccinia. Se utilizó la cepa de virus vaccinia recombinante VTF7-3.

Se utilizaron los plásmidos denominados pEMCKU4-8 y pEMCYM4 que codifican para las proteínas VP4 de rotavirus KU, de origen humano y rotavirus YM de origen porcino, respectivamente.

Purificación de plásmidos a gran escala limpiando con PEG

Se crece un cultivo de *E. coli* con el plásmido de interés en LB+ antibiótico toda la noche. Se toman 25 µl de este crecimiento para inocular 500 ml de LB+antibiótico en un matraz de 2 lt. Se incuba 2.5 h a 37°C con agitación vigorosa y se le adiciona cloranfenicol a 170 µg/ml. Se incuba de 12-16h a 37°C con agitación vigorosa. El cultivo se centrifuga a 7K por 15 min, la pastilla se resuspende en 100 ml de STE (NaCl 0.1 M, Tris HCl pH 8.0 10 mM, EDTA pH 8.0 1mM) frío. Se centrifuga a 7K por 15 min, la pastilla se resuspende en 10 ml de solución I (Glucosa 50 mM, Tris HCl 25 mM, EDTA 10mM, pH 8.0). Se adiciona 1 ml de solución de lisozima fresca (100µg/ml en Tris 10mM, pH 8.0) y 20ml de solución II (NaOH 0.2 N, SDS 1%) fresca, se invierte el tubo varias veces, y se deja 5-10 min a temperatura ambiente (T.A.)

Se adicionan 15ml de solución III (60ml de Acetato de Potasio 5 M + 11.5 ml de ácido acético glacial + 28.5 ml de agua) fría, se mezcla suavemente y se incuban en hielo 10 min. Se centrifuga a 5 K 20 min a 4°C (sin freno). El sobrenadante viscoso se transfiere a otro tubo y se filtra a través de 4 capas de gasa. Se agregan 0.6 vol de Isopropanol a T.A, se deja 10 min a T.A, y se centrifuga a 5 K 15 min a T.A..

Se lava la pastilla en 3 ml de TE (Tris HCl 10 mM. EDTA 1 mM pH 8.0). La solución se pasa a tubos corex 15 ml, se adicionan 3 ml de LiCl 5 M frío y se mezcla bien. Se centrifuga a 10 K 10 min a 4°C, el sobrenadante se transfiere a tubos corex de 30 ml. Se adiciona un volumen igual de isopropanol, se mezcla bien y se centrifuga a 10 K 10 min a T.A. Se desecha el sobrenadante cuidadosamente, se invierte el tubo y se lava la pastilla con etanol 70%.

La pastilla se disuelve en 500 µl de TE pH 8.0 conteniendo RNAsa libre de DNAsas (20µg/ml). Se transfiere a tubos eppendorf y se deja 30 min a T.A. Se adicionan 500 µl de NaCl 1.6 M con 13% de PEG 8000, se mezcla bien y se incuban 2 h o toda la noche a 4°C. Se centrifuga a 12 K 5 min, se aspira sobrenadante y la pastilla se resuspende en 400 µl de TE. Se extrae con un volumen de fenol, luego con 1 volumen de fenol-cloroformo y finalmente 1 volumen de cloroformo. La fase acuosa se transfiere, se le adicionan 100 µl de acetato de amonio 10M y se mezcla bien.

Se adicionan 2 volúmenes de etanol absoluto, se incuba 10 min a T.A y se centrifuga a 12 K, 5 min a 4°C. La pastilla se lava con 200 μ l de etanol 70%, se centrifuga a 12 K por 2 min a 4°C. Se aspira el sobrenadante, se deja secar la pastilla y se resuspende en 500 μ l de TE pH 8. Finalmente se mide la densidad óptica a 260/280 y se guarda a -20°C.

Ensayo cualitativo de sensibilidad a lipofectamina (Lfa)

Se crecen células MA104 hasta el 80% de confluencia en cajas de cultivo con pozos de 35mm, suficientes para los ensayos A, B y C. Se preparan diferentes mezclas de lipofectamina (GIBCO BRL, Life Technologies, Inc.) con 30 μ g, 20 μ g y 10 μ g, cada una en un volumen final de 100 μ l con agua estéril. Cada mezcla se prepara por duplicado.

Se retira el medio de cultivo de los pozos y se lava una vez con PBS y una vez con Optimem (Gibco). Se añaden 3ml de Optimem a cada pozo y se agrega por goteo la mezcla de lipofectamina a cada pozo por duplicado.

A.- Estos pozos se incuban por 18 h y se observan al microscopio.

B.- Estos pozos se incuban por 4 h, se retira el medio con lipofectamina, se lava una vez con Optimem, se agregan 3 ml de Optimem, se incuba por 14 h y se observa al microscopio

C.- Estos pozos se incuban por 6 h, se retira el medio con lipofectamina, se lava una vez con Optimem, se agregan 3 ml de Optimem, se incuba por 12 h y se observa al microscopio.

Ensayo de inmunodetección de focos para determinar el título infeccioso de los rotavirus

Se siembran células MA104 en placas de cultivo de 96 pozos hasta que llegan a confluencia. Se activan lisados de rotavirus con 1 μ l de tripsina al 1% por cada ml de lisado. Se preparan diluciones crecientes de lisados activados por duplicado y se incuban con las células MA104 por 12h a 37°C.

Se retira el medio de cultivo y se incuban 15 min con acetona 80% en PBS frío, para fijar y permeabilizar las células. Se lavan 2 veces con PBS y se dejan secar los pozos. Se añaden 50 μ l a cada pozo de una dilución de suero anti rotavirus (el anti YM se utilizó 1:1500) en PBS. Se incuba 1 h a 37°C. Se lava 2 veces con PBS, se añaden 50 μ l de proteína A-Peroxidasa diluida 1/2500 en PBS y se incuba 2 h a 37°C. Se lava dos veces con PBS, se agregan 50 μ l de substrato (3.5 ml de buffer acetatos 0.05 M pH 5.0, 1.5 ml de 9-amino etil carbazole (4 mg/ml en dimetil formamida) y 10 μ l de H₂O₂ al 30%).

Se cuenta el número de células teñidas y se calcula el número total de unidades formadoras de focos (ffu).

Este ensayo rutinariamente se utiliza para tefir células que han sido infectadas con rotavirus. En este trabajo también se utilizó para detectar células que expresan la proteína VP4 de rotavirus con el sistema de expresión temporal de vaccinia (en ausencia de rotavirus) para definir la eficiencia de transfección.

Producción de un lisado semilla del virus vaccinia

Se crece un cultivo de células BSC40 en un frasco de 75 cm² (F75), y se infectan con una m.o.i.=1 de vaccinia VTF7-3. Para la infección se toman 20 µl de virus vaccinia (~10⁷ pfu. "unidades formadoras de placas") y se mezcla con 200 µl de tripsina (al 0.25% en EDTA 1mM) y se incuba durante 60 min a 37°C. Se le adiciona 1 ml de medio de cultivo MEM (Gibco) con suero fetal bovino (SFB) al 10%, para neutralizar la tripsina. Se retira el medio de cultivo de los frascos con células BSC40 y se agrega el virus vaccinia. Se adsorbe durante 1 h a 37°C y luego se le adiciona 10 ml de MEM+SFB10% sin retirar el inoculo y se deja incubando durante 3 días.

Se cosechan las células infectadas del frasco F75 raspando el frasco con gendarme estéril, las células desprendidas se centrifugan 5 min a 1500rpm y se desecha el sobrenadante. La pastilla de células se resuspende en 6 ml de Tris 10mM pH 9.0 y se congela y descongela tres veces congelando con hielo seco más etanol y calentando a 37°C. Se adicionan 0.6 ml de tripsina 0.25% y se incuba 30 min a 37°C. Se adicionan 80 ml de MEM+SFB10%, se mezcla bien, y con esta mezcla se inoculan 8 frascos de 150 cm² (F150) con células BSC40 previamente crecidas a confluencia. Se adsorbe durante 60 min a 37°C. Se adicionan 10 ml de MEM+SFB10% a cada frasco, sin retirar el inóculo y se incuban a 37°C por 3 días.

Se cosechan las células raspando con un sargento y se centrifugan 5 min a 1500rpm. Las pastillas de células provenientes de todos los frascos F150 se resuspenden en 16 ml de Tris 10 mM pH 9 a 4°C. Todos los pasos siguientes deben realizarse en hielo. Se homogeneiza con 15 a 20 golpes del homogeneizador. El homogeneizado se centrifuga a 750 x g por 5 min a 4°C, para eliminar los núcleos de las células. El sobrenadante se guarda y la pastilla se resuspende una vez más en Tris 10 mM pH 9, se recentrifuga en las mismas condiciones. Ahora se desecha la pastilla y el sobrenadante se junta con el sobrenadante anterior. Se adicionan 0.1 volúmenes de tripsina, se incuba 30 min a 37°C agitando frecuentemente. Se prepara un tubo de centrifuga con una solución de sacarosa al 36% peso a volumen en tris 10 mM pH 9, y se pone encima sin mezclar el sobrenadante con virus vaccinia y se centrifuga a 25 000 x g (equivalente a 13,500 rpm en el rotor SW27) 80 min a 4°C. La pastilla con el virus se resuspende en 6 ml de Tris 10mM pH 9, se le agrega 0.6 ml de tripsina, se incuba a 30 min a 37°C agitando frecuentemente. Se pone sobre 6 ml de sacarosa al 36% y se centrifuga a 25000 x g (12000 rpm en el rotor SW40) 80 min a 4°C. La pastilla se resuspende en 3 ml de tris 1 mM pH 9, se reparte en alícuotas de 20 µl y se almacena a -70°C.

Ensayo en placa para titular al virus vaccinia

Se crecen células BSC40 en cajas con pozos de 35 mm. Se descongela una alícuota de 20 μ l de virus vaccinia, se le adicionan 180 μ l de tripsina (2.5 mg/ml) y se incuba 30 min a 37°C. Se adiciona 1 ml de MEM/SFB 10%, y se preparan diluciones seriadas por factor de 10 en 1 ml de MEM/SFB.

Se retira el medio de cultivo de cada uno de los pozos con células BSC40 y lavar una vez con PBS. Se adiciona 1 ml por pozo de las diluciones de virus vaccinia, y se incuba 1 h a 37°C. Se remueve el inoculo y se agregan 3 ml de MEM/SFB por pozo, se incuba 48 h a 37°C. Se retira medio de cultivo y se agrega a cada pozo 0.5 ml de 0.1% de cristal violeta (disuelto en etanol al 20%). Se incuba 5 min a TA, se retira el cristal violeta, se lava con PBS y se dejan secar los pozos.

Protocolo de coinfección de rotavirus y virus vaccinia

Este ensayo se realizó para conocer el comportamiento de ambos virus al coinfectar un cultivo de células MA104. Para ello se probó infectar primero con vaccinia e inmediatamente después con rotavirus, o viceversa, primero con rotavirus e inmediatamente después con vaccinia.

Se activan viales del stock de vaccinia y lisados de rotavirus con tripsina. Se neutraliza la tripsina, de los viales activados de vaccinia, con SFB. Se retira el medio de cultivo de los pozos de 35mm que contengan células MA104 al 80% de confluencia, se agrega el virus vaccinia y se incuba 1 h a 37°C. Se retira el medio de cultivo de los pozos que se infectan primero con rotavirus, se lava tres veces con MEM y se añade 0.5 ml de lisado activado de rotavirus. Se deja adsorbiendo 1 h a 37°C. Mientras se adsorben estos primeros virus, se ponen a activar otros viales, procurando que cuando termine el período de adsorción de los primeros virus ya estén activados los siguientes.

A.- Los pozos, donde inicialmente se absorbió vaccinia y pozos extras para inocular un control de rotavirus sin vaccinia, se lavan tres veces con MEM y se añade a cada pozo 0.5 ml de lisado activado de rotavirus y se incuba 1h a 37°C. Luego se retira el inoculo, se lava tres veces con MEM y se incuba por 18 h a 37°C.

B.- A los pozos inoculados inicialmente con rotavirus se las retira el inóculo y se lavan tres veces con MEM. A un pozo se le agrega 1ml de vaccinia, a otro pozo control solo se le agrega 1 ml de MEM+SFB al 10% (no incluye tripsina ni vaccinia). Se hace lo mismo para cada cepa de rotavirus que se pruebe. Se incuba durante 1 h, se retira el segundo inóculo, se lava cada pozo tres veces con MEM y se incuban por 18 h.

Al cabo de las 18 h de incubación se obtiene el lisado celular y se ensaya para titular la producción de rotavirus y vaccinia.

Protocolo de coinfección con vaccinia y rotavirus a diferentes tiempos

Virus Vaccinia	Hrs																
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
WV	YM																
WV			YM														
WV						YM											
WV								YM									
WV												YM					
WV																YM	

Seis pozos de 35 mm con células MA104 se infectan con virus vaccinia y cada uno de ellos se coinfecta con rotavirus YM a 0, 3, 6, 9, 12, y 15 horas. Las células se incuban por 18 horas después de la infección con rotavirus y se recupera el lisado para ensayar título de infectividad que se obtiene para cada virus.

Expresión de proteínas en células MA104

Se crecen células MA104 en placas con pozos de 35 mm hasta alcanzar 80 % de confluencia. Se activa el virus vaccinia (VV): 20µl de stock de VV (equivalente a 10^7 pfu), + 50µl de tripsina + 150µl de MEM y se incuba 30 min a 37°C. Antes de adicionar el virus vaccinia activado a las células se inactiva la tripsina agregando 1ml de MEM con suero al 10% a cada vial de VV activado. Se retira el medio de cultivo de los pozos con células, se añade el VV activado y se incuba 30 min a 37°C. Se lava 1 vez con PBS y una vez con Optimem y se agregan 3 ml de Optimem a cada pozo. Se agrega por goteo la mezcla DNA + lipofectamina (Lfa) y se incuba por 8 horas. Se retira el Optimem c/DNA+Lfa y se añade Optimem solo, se incuba 12 horas, se retira el Optimem y se agrega 1 ml de MEM sin metionina durante 30 min a 37°C.

Se retira el medio, se agrega MEM sin metionina + 40 µCi/ml Met-S³⁵ y se incuba 4 hrs a 37°C. Se retira la marca y se lava una vez con PBS. Se lisan las células con 250 µl de buffer de lisis (Tritón 1%, 150 mM de Na Cl, 50 mM de Tris pH 7.5, PMSF 20 µg/µl, Aprotinina 2µg/µl, Leupeptina 2µg/µl), se pasan a tubos eppendorf, se agita, se centrifuga 5 min a 14K y se guarda el sobrenadante a -20°C

Mezcla de Lipofectamina +DNA de plásmido :10 µl Lfa (20g) + 40 µl de agua= 50 µl

10 µg Plásmido + agua = 50 µl

Esta mezcla se hace en tubos de polipropileno y se incuba 15 min. a temperatura ambiente.

Nota: El protocolo original para expresión de proteínas en células BSC40 indica usar 30 µg de Lfa e incubar las células durante 18 horas, sin embargo las células MA104 resultaron más sensibles a Lfa, por ello se disminuyó la cantidad de Lfa y el tiempo de incubación.

Ensayo de inmunoprecipitación de proteínas marcadas con met-S³⁵

Se mezclan 20 µl de lisado de células marcadas con met-S³⁵, 80 µl de buffer RIPA (0.1% SDS, 1% deoxicolato de Sodio, 1% Tritón X-100, 150 mM NaCl, Tris 50 mM pH 7.5) y 5 µl de antisuero (hiperinmunes contra rotavirus, o bien el anti receptor de laminina). Se incuba 30 min a temperatura ambiente. Se centrifuga 5 min a 14 K en tubos eppendorf y se cambia el sobrenadante a un tubo nuevo. Se agregan 25 µl de sefarosa-proteína A al 50% en PBS. Se incuba 30 min a temperatura ambiente con agitación.

Se lava una vez con buffer RIPA con 1 mg/ml BSA (en cada lavado se centrifuga a 6K por 2 min). Se lava una vez con buffer RIPA y se resuspende en 15 µl de buffer de carga para geles de poliacrilamida. Se hierven las muestras 4 min, se centrifugan a 14 K 3 min y se carga el sobrenadante en carriles de geles de poliacrilamida.

Se corre el gel, se fija, se trata con Salicilato de sodio, se seca a 80°C por 2 h y se expone con películas para autoradiografía.

Ensayo de expresión de la proteína LRP con el sistema de vaccinia, en presencia de rotavirus

	②	3	4	⑤	6	7	⑧	9	10	11	12	13	14	15	16	17	Hrs.
VV+Lrp	YM																
VV+Lrp			YM														
VV+Lrp						YM											
VV+Lrp																	
VV			YM														
			YM														

Células MA104 crecidas en pozos de 35 mm se infectaron con virus vaccinia VTF3.5 y posteriormente se transfectaron con un plásmido que codifica por el receptor de laminina (LRP). A los tiempos indicados se coinfectó con rotavirus YM. 4 horas después de infectar con rotavirus se dió un pulso de marca con Met-S³⁵ durante 4 hrs (■). Al final de este periodo de marcaje las células se lisaron. El lisado celular se utilizó para ensayos de inmunoprecipitación con un anticuerpo policlonal anti-LRP

Ensayo para obtención de mezclas fenotípicas

	2	3	4	5	6	7	⑧	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	⑳	21	22	23	24	Hrs	
VV+KU/4							YM																		
VV+YM/4								TsA778																	
VV+KU/4								TsA778																	
VV+YM/4																									
VV+KU/4																									

En células MA104 se expresó la proteína VP4 de rotavirus KU (KU/4) y VP4 de rotavirus YM (YM/4) con el sistema de vaccinia recombinante, y se coinfectó con rotavirus YM o la cepa mutante tsA778 de rotavirus SA11 a diferentes tiempos post-vaccinia. 24 hrs después de haber infectado con rotavirus se obtuvieron las células y se procesaron como lisado de rotavirus.

Para el caso de la cepa de rotavirus SA11 TsA778 las células MA104 fueron incubadas a 31°C una hora antes de adicionar este virus y el resto de la incubación se realizó también a 31°C.

Ensayo de neutralización

Se prepararon diluciones de lisados de cada uno de los virus a probar para tener aproximadamente 1000 focos infecciosos por un pozo de caja de 96. YM 1:800 (5×10^7), Wa 1:32 (1.7×10^6) y para la mezcla fenotípica YM/KU4 (1.2×10^7) y se activaron con tripsina. Se preparó una dilución 1:16000 de cada uno de los anticuerpos a utilizar tanto YM6 (específico contra VP4 de la cepa YM) como YO2C2 (específico contra VP5).

Se mezclan 60 μ l de suero con 60 μ l de lisado activado y se preincuban en cajas de 96 pozos 1 hora a 37°C. Células MA104 crecidas en cajas de cultivo de 96 pozos se les retira el medio de cultivo y se lavan dos veces con MEM. Cada pozo se inocula con 100 μ l de rotavirus preincubado con cada uno de los anticuerpos y se incuba 1 h a 37°C. Se lava 1 vez con MEM y se agregan 150 μ l de MEM por pozo y se incuba de 12 a 14 h. Se tiñen las células con la técnica de inmunoperoxidasa y se cuenta el número de focos infecciosos.

Ensayo de sensibilidad a neuraminidasa

Células MA104 crecidas en cajas de cultivo de 96 pozos se les retira el medio de cultivo y se lavan dos veces con MEM. A cada pozo se le agregan diluciones seriadas por factor de 2 de neuraminidasa (*Artrobacter urefaciens*) partiendo de 40 mU/ml y se incuban por 1 h a 37°C. Se lavan dos veces con MEM. Cada pozo se inocula con igual cantidad de rotavirus y se incuba 1 h a 37°C. Se lava 1 vez con MEM y se agrega 150 μ l de MEM por pozo y se incuba de 12 a 14 h. Las células se tiñen con la técnica de inmunoperoxidasa y se cuenta el número de focos infecciosos.

Ensayo de inmunodetección de focos para determinar el título infeccioso de los rotavirus termosensibles

Se siembran células MA104 en placas de cultivo de 96 pozos a 37°C hasta que llegan a confluencia. Las células se incuban a 31°C y a 39°C por separado durante una hora. Durante este tiempo se activan lisados de rotavirus con 1 μ l de tripsina al 1% por cada ml de lisado. Se preparan diluciones crecientes de lisados activados por duplicado para cada condición de temperatura y se incuban a 31°C y a 39°C por 1 hora. Se adicionan los lisados respectivos de cada temperatura a las células y se incuban MA104 por 12h a cada una de las dos temperaturas. Los pasos de fijación, permeabilización y tinción se realizan como en el ensayo de inmunodetección de focos.

Una vez determinado el título de los lisados de rotavirus termosensible a ambas temperaturas, 31°C y 39°C, se compara la infectividad en ambas condiciones, para conocer el grado de termosensibilidad de la cepa de rotavirus.

RESULTADOS

Expresión de la proteína VP4 de los rotavirus YM y KU, con el sistema de virus vaccinia vTF7-3

La proteína VP4 del rotavirus porcino YM y del rotavirus humano KU se expresaron en células MA104 con el sistema del virus vaccinia que expresa la RNA polimerasa del fago T7. Los lisados celulares obtenidos se inmunoprecipitaron con sueros hiperinmunes contra rotavirus y se analizaron en geles de poliacrilamida. Se observó la producción de las proteínas del peso molecular esperado (Fig. 1).

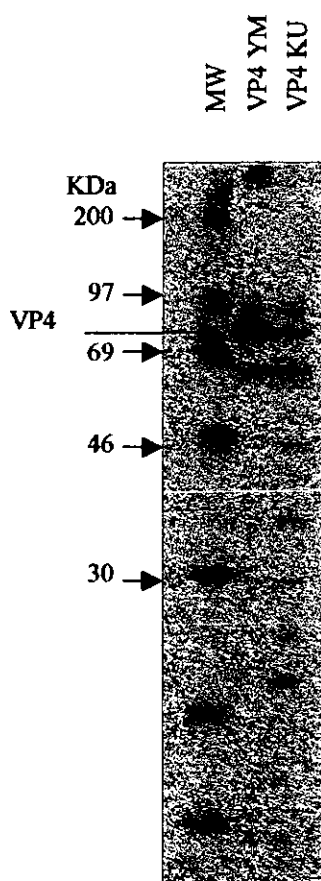


Figura 1. Autorradiografía de gel de poliacrilamida-SDS de proteínas inmunoprecipitadas con anticuerpos anti-VP4, utilizando lisados celulares de ensayos de expresión transitoria con virus vaccinia, en los que se expresó VP4 de YM y VP4 de KU por separado.

Caracterización de la eficiencia de transfección

La detección de las células MA104 que expresan la proteína VP4 de YM en los ensayos de expresión transitoria con virus vaccinia, se realizó con la técnica de inmunoperoxidasa, utilizando un suero hiperinmune anti-rotavirus (Figura 2). Esto muestra que la expresión de VP4 en este sistema es suficiente para ser detectado por esta técnica de tinción mediada por anticuerpos.

Para que una proteína se sintetice mediante el sistema de expresión transitoria con el virus vaccinia, es necesario que se cumplan al menos dos condiciones: a) que las células sean infectadas eficientemente con virus vaccinia, y b) que durante el proceso de transfección las mismas células adquieran el plásmido vector con el gen de interés. Puesto que la cantidad de virus vaccinia recombinante con que se infecta es de 10 ufp por célula (m.o.i.=10), con esto se asegura que el 99% de las células se infecten con vaccinia (Flint *et al*, 2000). De esta manera, muy probablemente el proceso de transfección sea el que esté limitando la cantidad de células que expresan la proteína heteróloga. En un intento de trabajar en las condiciones más eficientes posibles se probaron condiciones de transfección en las que se combinaron diferentes cantidades de DNA y de lipofectamina (Lfa). La eficiencia de transfección se midió como el porcentaje de células teñidas del total de una monocapa. Este valor osciló entre un 13% y un 48%. La utilización de 10 μ l de Lfa con 1 ó 5 μ g de DNA ofreció los mejores resultados (no se muestra).

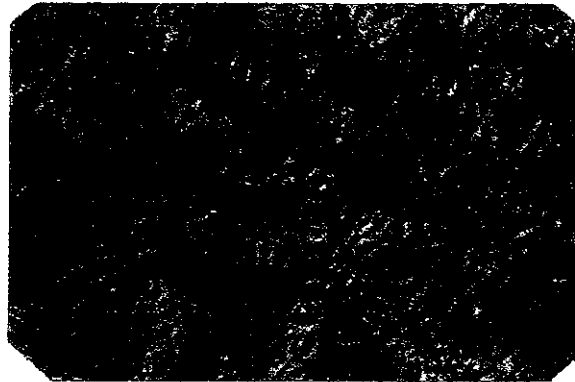


Figura 2.- Detección de células MA104 que expresan VP4 de YM a partir del sistema de expresión transitoria del virus vaccinia, utilizando el método de detección de focos infecciosos con inmunoperoxidasa. Las células que expresan la proteína VP4 se observan teñidas de rojo.

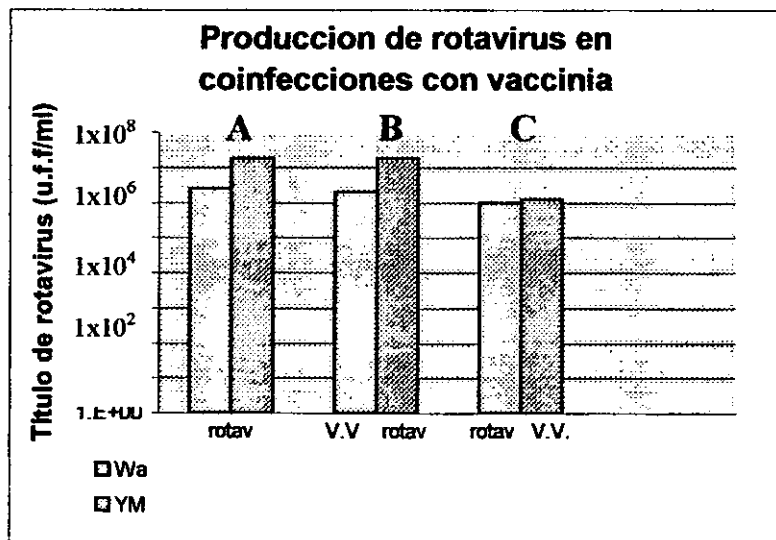


Figura 3.- Efecto de la presencia de vaccinia sobre la producción de rotavirus en células MA104. A) Rotavirus solo; B) Se infecta primero con vaccinia e inmediatamente después con rotavirus; C) Se infecta primero con rotavirus e inmediatamente después con vaccinia.

Ensayos de coinfección de rotavirus y vaccinia recombinante

Para conocer cómo se comportan los rotavirus y vaccinia al coinfectarlos en un cultivo, se realizaron ensayos en los que células MA104 fueron infectadas ya sea con rotavirus YM o con rotavirus Wa y coinfectadas con virus vaccinia, utilizando diferentes condiciones. Al cabo de 18 hrs de incubación se tituló el lisado celular para cuantificar la producción de rotavirus. El título infeccioso para cada uno de los rotavirus YM y Wa, en ausencia de vaccinia (control) se muestra en la figura 3 (A). En la figura 3 (B) se muestra los resultados cuando se infecta primero con virus vaccinia e inmediatamente después con rotavirus Wa o YM. Se observa que el título tanto de los rotavirus Wa (cepas de origen humano) como de YM no se altera significativamente respecto del control sin vaccinia. Cuando se infecta primero con rotavirus e inmediatamente después con vaccinia, se observa que el título del rotavirus Wa se reduce al 50% y el título de YM se reduce 10 veces respecto de los controles (Figura 3C). La reducción del título de rotavirus en esta última condición parece no depender de la presencia de vaccinia, ya que un ensayo control en el que se infecta con rotavirus e inmediatamente se realizan los mismos pasos que cuando se infecta con vaccinia, sólo que a este no se le adiciona el lisado activado de vaccinia, sino medio de cultivo con suero, sucede lo mismo (no se muestra). Ya previamente se ha reportado que el suero, en el medio de cultivo, inhibe la infectividad de rotavirus.

Los resultados anteriores indican que la producción de rotavirus infectivo no se altera considerablemente en presencia de vaccinia cuando se infecta primero con este virus e inmediatamente después con rotavirus. Sin embargo, cuando se midió la producción de virus vaccinia en estas mismas condiciones se observó que vaccinia si se altera considerablemente en presencia de rotavirus.

La figura 4 muestra los títulos de rotavirus YM y de vaccinia que se recuperan de diferentes ensayos de coinfección en los que se infecta primero con vaccinia y después, a diferentes tiempos, se infecta con rotavirus YM. En el tiempo cero la infección con YM se realiza inmediatamente después de vaccinia.

Efecto sobre el título del virus vaccinia y del rotavirus YM, durante una coinfección.

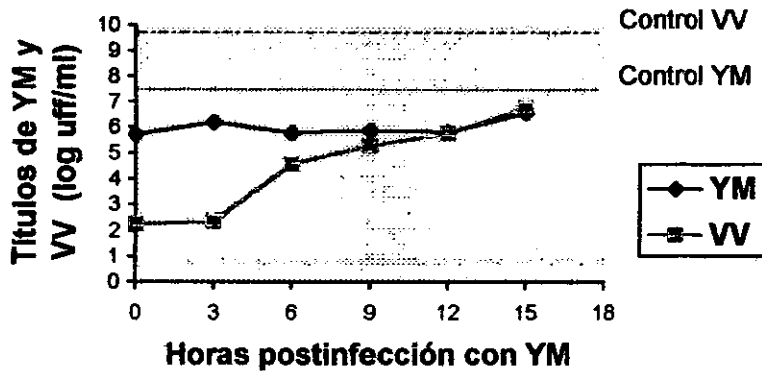


Figura 4.- Efecto sobre el rendimiento del virus vaccinia y del rotavirus YM, cuando se infecta primero con vaccinia, seguido de rotavirus a diferentes tiempos. Se muestran los títulos de infectividad de la progenie de rotavirus y vaccinia obtenida de una coinfección con ambos virus. En todos los casos, primero se infecta con virus vaccinia y en cada caso particular se infecta con rotavirus YM a diferentes tiempos después de la infección con vaccinia, como se indica. Las líneas horizontales punteadas indican los valores de título para rotavirus y para vaccinia cuando se infectan células MA104 por separado.

En esta figura se observa que la producción de virus vaccinia (vv) disminuye considerablemente cuando se coinfecta con rotavirus al mismo tiempo (tiempo 0), o 3 horas después de haber infectado con vaccinia, comparado con la infectividad del control en las mismas condiciones pero en ausencia de rotavirus (control VV). Además, la infectividad del virus vaccinia se recupera a medida que se deja transcurrir más tiempo entre la infección de vaccinia y la coinfección con rotavirus. También se observa que el título de rotavirus no se altera considerablemente en las diferentes condiciones, comparado con la infectividad del control (control YM).

Estos resultados sugieren que rotavirus ejerce un mecanismo de inhibición sobre la producción de virus vaccinia. Esta inhibición puede tener importancia en estudios básicos sobre la interacción de estos dos virus; sin embargo, en este caso podría representar un problema, ya que podría quedar comprometida la expresión transitoria de la proteína heteróloga en presencia de rotavirus.

Expresión transitoria de una proteína control, el receptor de laminina, con el sistema del virus vaccinia en presencia de rotavirus.

Para conocer si la presencia de rotavirus altera la expresión de un gen bajo el control del promotor de la RNA polimerasa del fago T7, cuando se utiliza el sistema de expresión transitoria de vaccinia, se realizaron ensayos de coinfección, transfección y expresión del receptor de laminina como una proteína control. Se infectó con rotavirus a diferentes tiempos (2, 5 y 8 horas) después de infectar con vaccinia y de transfectar el plásmido que expresa el receptor de laminina. Para monitorear la proteína expresada en estas condiciones se adicionó metionina- S^{35} durante 4 horas, comenzando a marcar 4 horas después de haber infectado con rotavirus. Al final del ensayo las células fueron lisadas y el medio clarificado. El receptor de laminina se inmunoprecipitó con un suero hiperinmune de conejo dirigido contra esta proteína. Las proteínas inmunoprecipitadas se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida, el cual se procesó y reveló por autoradiografía.

En este ensayo se utilizó un plásmido que contiene un gen que codifica para el receptor de laminina (LRP), una proteína no relacionada con rotavirus. De esta manera se puede seguir fácilmente la producción de esta proteína sin que haya interferencia con las proteínas de rotavirus que se expresan también durante el ensayo.

El resultado se puede observar en la figura 5, se observa que no es posible detectar la expresión de la proteína LRP cuando se infecta con rotavirus YM a las 2 ó 5 horas después de vaccinia. Sin embargo, cuando se infecta a las 8 horas después de vaccinia si es posible detectar una banda correspondiente a la proteína LRP.

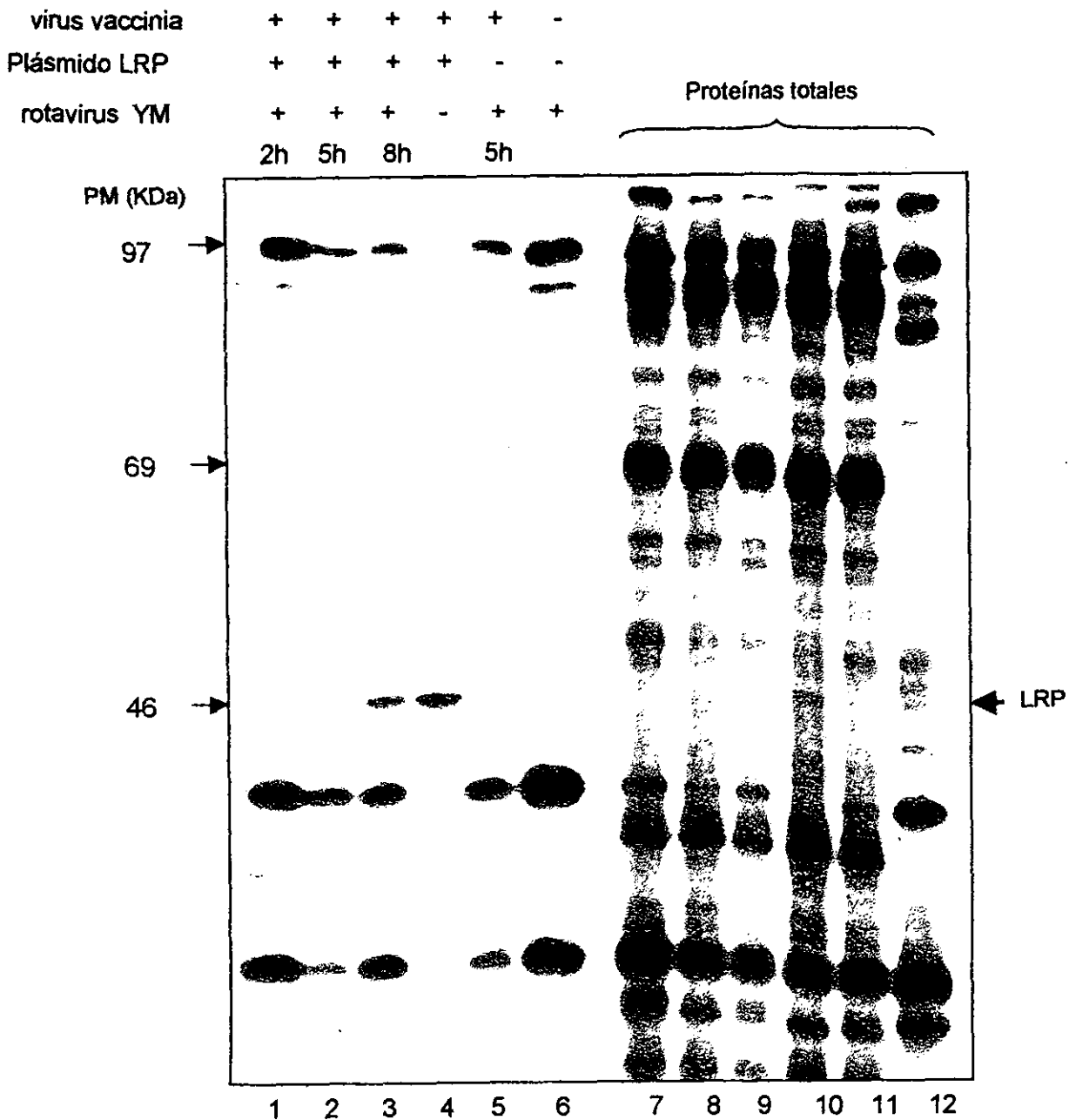


Figura 5.- Electroforesis en gel de poliacrilamida de proteínas marcadas con Met-S³⁵ y revelado en placa de autorradiografía. Se muestra el patrón de inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-LRP (carril 1-6) y las proteínas totales (carril 7-12), en un ensayo de expresión transitoria del receptor de laminina en presencia de rotavirus.

Este ensayo nos permite conocer que, a tiempos cortos de coinfección, la inhibición que ejerce rotavirus sobre vaccinia sí se refleja en la expresión de la proteína codificada en el plásmido. Además, indica que un lapso de 8 horas entre la infección de vaccinia y la infección con rotavirus da oportunidad para que se exprese la proteína LRP codificada por el plásmido. En este ensayo no se probaron períodos de tiempo mayores debido a que, a medida que transcurre el tiempo después de la infección con vaccinia, las células se redondean y se desprenden con facilidad del fondo de la placa de cultivo, esto dificulta los pasos posteriores de coinfección con rotavirus y el marcaje con metionina radioactiva.

Una vez estandarizadas las condiciones de transfección y de coinfección con vaccinia recombinante y rotavirus, se realizaron ensayos de coinfección para buscar mezclas fenotípicas de rotavirus en los lisados. Para estos ensayos las células MA104 fueron infectadas con vaccinia VTF7-3 y tranfectadas con un plásmido que lleva el gen de VP4 de la cepa de rotavirus de origen humano KU. 8 horas después de haber infectado con vaccinia, las células se infectaron con rotavirus de origen animal YM. Los lisados obtenidos se probaron en ensayos de neutralización (Figura 6) y de sensibilidad a neuraminidasa (Figura 7).

Ensayos de neutralización

La infectividad de las cepas de rotavirus se puede neutralizar utilizando anticuerpos monoclonales específicos dirigidos contra la proteína VP4 (Ruggeri 1991). El anticuerpo neutralizante YM6, específico de VP4 del rotavirus YM, neutraliza eficientemente a YM y no neutraliza a la cepa Wa. El anticuerpo YO2C2, específico de VP4 de rotavirus humano Wa, neutraliza eficientemente a Wa y KU y no neutraliza a la cepa YM. Con estos anticuerpos monoclonales específicos fue posible detectar mezclas fenotípicas en una progenie de rotavirus YM/KU4, es decir, donde se expresó la proteína VP4 de rotavirus KU y se coinfectó con rotavirus YM.

En la figura 6 se muestran los resultados como el porcentaje de infectividad remanente después de incubar los virus con cada uno de los anticuerpos YM6 y YO2C2, y se compara con la infectividad del virus control, en ausencia de

anticuerpos, expresada como el 100%. Se observa que la infectividad de rotavirus Wa se abate completamente en presencia del anticuerpo YO2C2, mientras que con el anticuerpo YM6 se reduce en un 12%. Por otra parte la infectividad de rotavirus YM se inhibe completamente con el anticuerpo YM6, mientras que el anticuerpo YO2C2 prácticamente no le afecta.

Ensayo de neutralización de la Infectividad

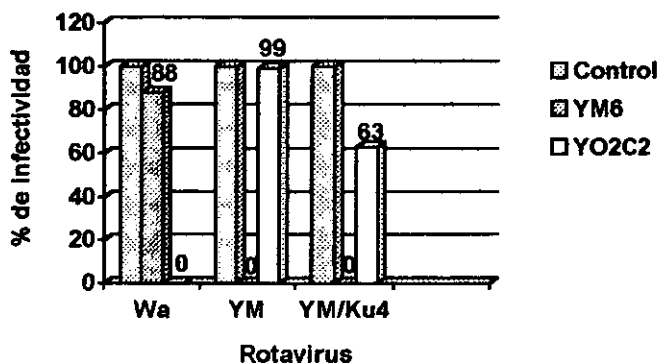


Figura 6.- Comparación de los niveles de neutralización de la infectividad de cepas control de rotavirus (Wa y YM) y de la progenie YM/KU4. Cada cepa fue probada con el anticuerpo monoclonal YM6, el cual neutraliza específicamente el rotavirus YM, pero no el rotavirus Wa, así como con el monoclonal YO2C2 el cual específicamente neutraliza a los rotavirus de humano Wa y KU (de donde se deriva la proteína VP4 expresada del plásmido), pero no al rotavirus YM. La barra control en cada caso es la infectividad en ausencia de anticuerpo que se estableció como el 100% para cada caso.

La progenie de la coinfección YM/KU4 es neutralizada completamente por el anticuerpo YM6, sin embargo, cuando se prueba con el anticuerpo YO2C2 se observa que la infectividad se reduce a un 63%. Esto significa que YO2C2 reconoce y neutraliza efectivamente un porcentaje de alrededor del 35% de la progenie infecciosa YM/KU4. Esto indica que muy probablemente un porcentaje similar de la progenie infecciosa de YM contiene la proteína VP4 heteróloga de KU. Sin embargo se esperaría que esta misma proporción de la progenie ya no fuera neutralizada por el anticuerpo YM6, pero como se observa el total de la progenie infecciosa es neutralizada por YM6. Una explicación para esta observación es que las partículas de rotavirus con VP4 heteróloga son partículas en forma de mosaicos que contienen ambas VP4 en su estructura por lo que podrían ser neutralizadas por ambos anticuerpos, YM6 y YO2C2. Además el dato de que el anticuerpo YM6 neutraliza en un 12% al virus WA indica que partículas de rotavirus que contengan únicamente VP4 heteróloga podrían ser neutralizadas, sobre todo si su porcentaje dentro de la progenie infecciosa es bajo.

Sensibilidad a neuraminidasa

En la figura 7 se muestra el resultado de los ensayos de sensibilidad a neuraminidasa de la progenie YM/KU4 y de rotavirus YM. Se encontró que en el intervalo de entre 0.04 y 1.25 mU/ml de neuraminidasa, la progenie YM/KU4 se mantiene de un 20% a un 30% superior respecto de la infectividad de YM. Sin embargo, a concentraciones mayores de 2.5 mU/ml de neuraminidasa la infectividad de la progenie YM/KU4 se reduce al mismo nivel que YM.

Este resultado indica que, a bajas concentraciones de neuraminidasa, la progenie YM/KU4 es 30% menos sensible, y que su requerimiento de ácido siálico es diferente respecto a YM. Este comportamiento sugiere que partículas de rotavirus de la progenie YM/KU4 incorporaron en su estructura la proteína VP4 de rotavirus KU. Este resultado es coherente con el obtenido en los ensayos de neutralización. En ambos ensayos se encuentra que la diferencia entre la progenie YM/KU4 y rotavirus YM es en promedio un 30%. Estas diferencias sugieren fuertemente la existencia de mezclas fenotípicas.

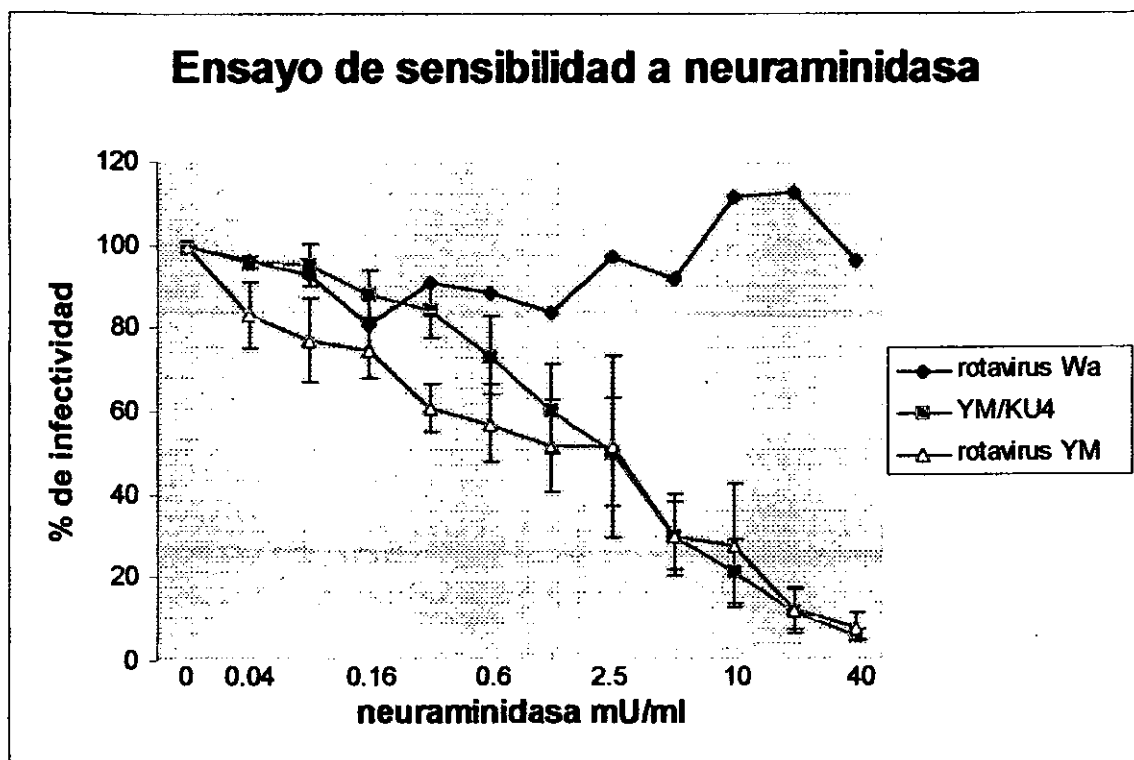


Figura 7. Niveles de infectividad de la cepa de rotavirus porcino YM, la cepa de origen humano Wa y de la mezcla fenotípica YM/KU4, en células MA104 pretratadas con diferentes concentraciones de neuraminidasa. La gráfica representa el promedio de tres ensayos diferentes.

Rescate de mutantes termosensibles mediante mezclas fenotípicas

La cepa mutante termosensible TsA778 de rotavirus SA11 se utilizó como aceptor de la proteína VP4 heteróloga, tanto de YM como de KU. Puesto que la termosensibilidad de esta cepa es debida a una mutación en la proteína VP4, se exploró la posibilidad de que cualquiera de las proteínas VP4 de YM o VP4 de KU, por separado, se pudieran incorporar a partículas virales del mutante TsA778 y así restablecer el fenotipo normal, esto es, eliminar o disminuir la termosensibilidad de la cepa.

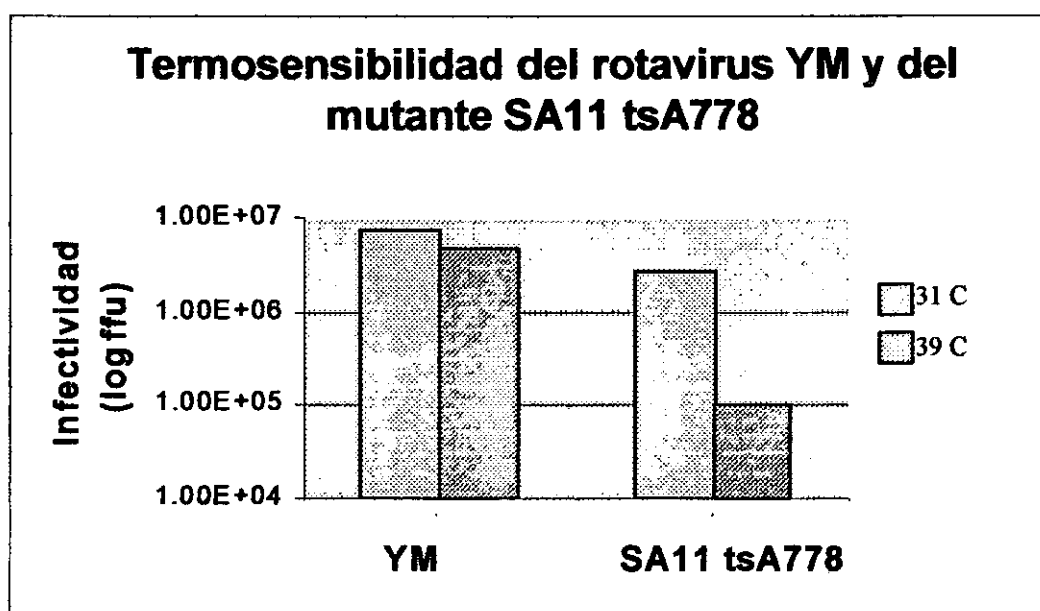


Figura 8. Gráfica de infectividad de una cepa normal de rotavirus (YM) y la cepa mutante termosensible tsA778 (derivada del rotavirus de simio SA11) a la temperatura permisiva (31°C) y a la temperatura restrictiva (39°C)

En la gráfica de la figura 8 se muestra la infectividad de la cepa termosensible TsA778 respecto a la cepa YM. La infectividad de YM a 39°C baja a un 64.5% respecto a su infectividad a 31°C. La infectividad de TsA778 a la temperatura restrictiva de 39°C es de un 3.8% respecto a su infectividad a la

temperatura permisiva de 31°C. Es decir, con las condiciones de cultivo probadas en este trabajo, la infectividad del mutante termosensible TsA778 a la temperatura restrictiva se reduce alrededor de 25 a 30 veces, respecto a la temperatura permisible. La reducción reportada originalmente para esta mutante es de más de 10,000 veces (Gombold 1987).

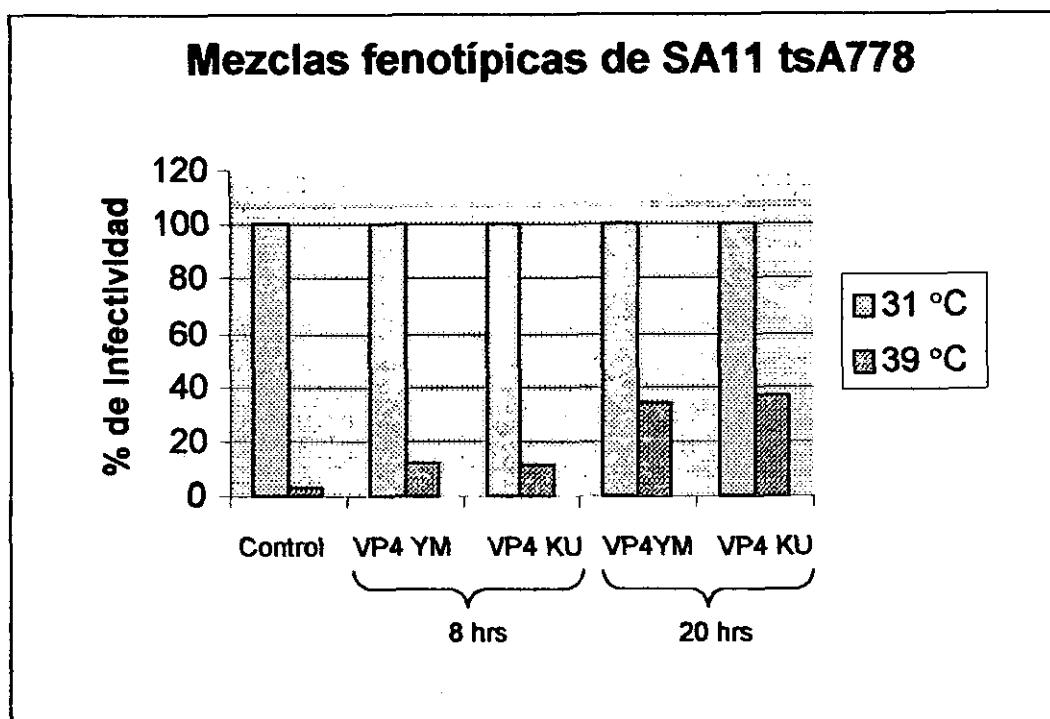


Figura 9. – Termosensibilidad de las mezclas fenotípicas de la cepa tsA778 con la proteína VP4 de rotavirus YM y VP4 de rotavirus KU, comparadas con la termosensibilidad de virus mutante control.

Los ensayos para generar mezclas fenotípicas consistieron en expresar la proteína VP4 del rotavirus KU o del rotavirus YM con el sistema de vaccinia y coinfectar con rotavirus mutante TsA778 de SA11. En ambos casos se probaron dos condiciones de tiempo, 8 horas y 20 horas, entre la infección con vaccinia y la coinfección con rotavirus. La infección con virus vaccinia y la incubación previa a la infección con rotavirus se realizó a 37°C, pero una hora antes de infectar con rotavirus termosensible y todo el ciclo de replicación de este último la temperatura de incubación fue de 31°C. Los lisados obtenidos se titularon a 31°C y a 39°C. La cepa control tsA778 fue coinfectada con vaccinia excepto que no fue transfectada con ningún plásmido.

En la figura 9 se muestran los títulos de la cepa mutante TsA778 y de las mezclas fenotípicas a 39°C, expresados como porcentaje respecto al título a 31°C considerado como el 100%. Las progenies TsA778/YM4 y TsA778/KU4 que se obtienen al infectar con rotavirus a las 8 horas post-vaccinia, muestran una recuperación de infectividad a la temperatura restrictiva de hasta un 10%. La progenie que se obtiene cuando se infecta con rotavirus 20 horas después de vaccinia muestra una recuperación de infectividad a la temperatura restrictiva de alrededor de un 35%. Estos porcentajes de rescate de mutantes termosensibles son iguales para ambas proteínas VP4 utilizadas.

DISCUSION

En este trabajo se montaron las condiciones para coinfectar rotavirus y virus vaccinia recombinante VTF7-3 en células MA104, transfectadas con un plásmido vector que expresa una proteína VP4 heteróloga de rotavirus. Los lisados celulares se analizaron mediante ensayos de neutralización de la infectividad, sensibilidad a neuraminidasa y ensayos de rescate de mutantes termosensibles. Los resultados sugieren que rotavirus es capaz de incorporar la proteína VP4 heteróloga como parte de la partícula viral madura, generando partículas con mezcla fenotípica dentro de la progenie.

Los primeros resultados de este trabajo mostraron que rotavirus es capaz de inhibir la infectividad de vaccinia durante una coinfección. Se conoce que rotavirus inhibe la síntesis de proteínas celulares en las primeras horas después de la infección. Piron et al (1998), han sugerido que el mecanismo mediante el cual los rotavirus ejercen su efecto inhibitorio sobre la síntesis de proteínas celulares está mediado por la proteína de rotavirus NSP3. Esta proteína se une específicamente al extremo 3' de los mRNAs de los rotavirus, los cuales, a diferencia de los mRNAs celulares, no contienen una región de Poli(A). NSP3 también interacciona directamente con el factor de traducción eIF4G1. Se ha probado que esta interacción desplaza la unión de la proteína PABP ("poli(A)-binding protein"), con el factor eIF4G1. La interacción simultánea de la proteína PABP con eIF4G1 y con la región poli(A) presentes en los extremos 3' de los mRNAs celulares, es necesaria para que estos mensajeros se traduzcan eficientemente (Piron 1998). Todos los transcritos de el virus vaccinia tienen cap en su extremo 5', y están poliadenilados en el extremo 3', igual que un típico mRNA eucariótico (Moss 1996). Puesto que el virus vaccinia utiliza la maquinaria celular para traducir sus mRNAs es probable que la inhibición de vaccinia observada en presencia de rotavirus sea debida a un proceso general de inhibición de síntesis de proteínas celulares y del virus vaccinia por desplazamiento de la unión de la proteína PABP al factor eIF4G1, causado por la proteína NSP3 de rotavirus.

Las proteínas correspondientes a los genes 2, 4, 6 y 9 (Andrew 1987, Offit 1980) de rotavirus SA11 ya han sido expresadas previamente, con el sistema de vaccinia recombinante, en células BSC 1. Posteriormente, Taylor y col. (1992) expresaron la proteína NS28 en células CV-1, hicieron un análisis funcional de la proteína expresada y demostraron que, en esas condiciones, la oligomerización y la localización subcelular de NS28 ocurre de manera similar que durante la infección de rotavirus. Estos reportes demuestran que proteínas de rotavirus pueden ser eficientemente expresadas con el sistema de vaccinia y que pueden desplegar sus propiedades funcionales.

No hay ningún reporte hasta el momento, de trabajos en los que se haya incorporado una proteína recombinante a una partícula de rotavirus. Los trabajos que más se aproximan han logrado coexpresar varias proteínas estructurales y así obtener partículas pseudovirales (González, 1995). Para el caso de reovirus, utilizando el sistema de células COS, y a pesar de tener una eficiencia de transfección del 1%, se ha demostrado que es posible recuperar viriones que incorporan una proteína $\sigma 1$ heteróloga al coinfectar con un reovirus de serotipo diferente (Mah, 1990).

Los tres enfoques utilizados en el presente trabajo para demostrar la presencia de mezclas fenotípicas sugieren que éstas si están ocurriendo, y el porcentaje de partículas con mezcla fenotípica parece correlacionar con el porcentaje de la eficiencia de transfección. Es evidente que la eficiencia de transfección en los ensayos de expresión fue determinante, y se podría establecer como el paso limitante en el ensayo.

Similares porcentajes de eficiencia de transfección se han reportado para reactivos como FuGENE6 (Roche) en células HEC-1B (Moser, 1999). Para lípidos catiónicos como Lipofectamina, se han reportado eficiencias de transfección de hasta 80% en células NIH-3T3 que expresan β -galactosidasa; sin embargo, la eficiencia de este mismo reactivo disminuye en otras células (Hawley-Nelson, 1993). Es posible que cualquier estrategia que permita incrementar el número de células que expresen la proteína heteróloga redunde en un incremento en el porcentaje de mezclas fenotípicas de rotavirus.

De acuerdo a los resultados de neutralización y de sensibilidad a neuraminidasa, se puede inferir que al menos un 30 % de las partículas virales de la progenie YM/KU4 contienen VP4 heteróloga; sin embargo, muy probablemente estas mismas partículas contengan también la proteína VP4 homóloga, por el hecho de que la infectividad de ésta progenie se reduce completamente a altas concentraciones de neuraminidasa. En estas condiciones la sensibilidad a neuraminidasa de la mezcla fenotípica YM/KU4 es igual que la de rotavirus YM

Si el 30% de la progenie tuviera en su totalidad sólo VP4 heteróloga se esperaría que este mismo porcentaje de la población mantuviera la resistencia aún a altas concentraciones de neuraminidasa. No se puede descartar la posibilidad de que la función de la VP4 heteróloga cuyo origen es de un virus humano, se vea alterada al incorporarse en una partícula viral de origen animal. Análisis de virus rearreglantes y mutantes de escape a neuraminidasa sugieren que una proteína VP4 puede manifestar propiedades biológicas diferentes dependiendo del fondo genético en el que se encuentre, muy probablemente debido a las interacciones que establece con otras proteínas, como VP7 (Chen, 1992; Méndez, 1996). Esta posibilidad es difícil de evaluar con los resultados de este trabajo.

La mezcla fenotípica del rotavirus YM con la proteína VP4 del rotavirus KU contiene suficientes moléculas de VP4 de KU para poder ser neutralizadas por el anticuerpo YO2C2, el cual en las mismas condiciones no neutraliza al rotavirus YM. Pero la presencia de estas moléculas de VP4 heterólogas no es suficiente para conferirle resistencia a altas concentraciones de neuraminidasa. De acuerdo con Ruggeri (1991), anticuerpos neutralizantes dirigidos contra VP5 neutralizan la infectividad de partículas del rotavirus rhesus (RRV), inhibiendo un paso posterior al pegado del virus a las células huésped, y la cinética de inhibición indica que la mayoría de las moléculas de VP4 de un virión deben estar bloqueadas con anticuerpos para que la infectividad se abata completamente. De acuerdo con lo anterior, se puede pensar que las partículas con mezclas fenotípicas de YM/KU4 contienen una mayoría de VP4 de KU puesto que el anticuerpo YO2C2 (que se une a VP5) es capaz de neutralizarlas.

Los resultados obtenidos sugieren que aproximadamente el 30 % de las partículas infectivas contiene la proteína heteróloga puesto que son neutralizadas por el anticuerpo YO2C2, pero ninguna de ellas es resistente a altas concentraciones de neuraminidasa. Es decir, el número de VP4 heterólogas que contienen estos virus es suficiente para que sean neutralizados pero no bastan para conferir infectividad en ausencia de ácido siálico. Esto sugiere que el número o la distribución de las proteínas heterólogas de VP4 no es el adecuado para favorecer el fenotipo de resistencia a neuraminidasa.

No hay estudios que indiquen el número de moléculas o dímeros de VP4 mínimos indispensables para que ocurra una adecuada unión y penetración a la célula huésped. Es posible que rotavirus requiera la interacción conjunta de un número mínimo de espículas de la cápside externa con una región de la célula huésped, y que la acción conjunta de todas las espículas permita la penetración productiva. Para el caso de las mezclas fenotípicas, si la interacción de este número mínimo de espículas ocurre mediante la vía de los virus animales, o mediante la vía de los virus humanos no importaría tanto, mientras cada una de ellas sea funcional. Con esta idea, la presencia de una sola molécula no funcional aún rodeada de suficientes moléculas funcionales sería suficiente para bloquear la infección. Es decir, con una sola molécula de VP4 que requiera de la unión de ácido siálico, presente entre varias moléculas de VP4 que no requieren de ácido siálico, sería posible abatir la infectividad en presencia de neuraminidasa.

Un enfoque que permitiría salvar algunos de los problemas mencionados es eliminar la expresión de la proteína VP4 homóloga y sólo tener la expresión de la proteína VP4 heteróloga, y asegurar que la VP4 que se quiere estudiar sea la única presente. Con esta idea se montó el ensayo de expresión y coinfección utilizando la cepa termosensible tsA778. En este caso no se elimina la expresión de la proteína VP4 homóloga, pero si es posible eliminar el fondo que produce la población de virus termosensible, cuando se infecta a la temperatura restrictiva.

Con las condiciones utilizadas en el presente trabajo no se pudo reproducir el dato previamente publicado para la diferencia de infectividad de la cepa mutante a la temperatura restrictiva, respecto a la temperatura permisible, de 10,000 veces.

En este trabajo el valor que se encontró fue de 30 veces, pero esta diferencia fue suficiente para estudiar el rescate de mutantes termosensibles. El valor de 10%, de rescate de mutantes termosensibles, que se observa a las 8 horas es menor que el valor observado en los ensayos previos de neutralización y sensibilidad a neuraminidasa con rotavirus YM y Wa. No hay una explicación clara para esto, es posible que sea reflejo de que el rotavirus termosensible es crecido a una menor temperatura. Cuando se aumenta el tiempo a 20 horas, entre la infección con vaccinia y la coinfección con rotavirus, el porcentaje de la población que pierde la termosensibilidad correlaciona con la eficiencia de transfección. Esto indica que se requiere un mayor número de moléculas de VP4 heterólogas para que se obtenga un mayor número de mezclas fenotípicas.

Los ensayos de rescate de mutantes termosensibles son muy claros y demuestran que efectivamente una proteína VP4 heteróloga está siendo incorporada a la partícula viral madura y le confiere la capacidad de infectar a la célula huésped a la temperatura restrictiva. Es interesante observar que tanto la proteína VP4 de origen porcino como la proteína VP4 de origen humano son capaces de rescatar las mutantes termosensibles, del rotavirus de simio, con iguales valores de recuperación de infectividad a la temperatura restrictiva.

De acuerdo con los resultados de este trabajo las propuestas que surgen para mejorar el alcance de este estudio comienzan por considerar que es necesario incrementar el porcentaje de células que expresen la proteína heteróloga, ya sea aumentando la eficiencia de transfección o estableciendo líneas transformadas permanentes. Además, es claro que el uso de la cepa de rotavirus termosensible SA11 TsA778 es la que ofrece mejores perspectivas para demostrar la capacidad de integrar proteínas heteólogas mediante este sistema de expresión transitoria y posiblemente se mejore el rendimiento si se utiliza la proteína VP4 propia de SA11 no termosensible. Sin embargo, queda pendiente evaluar la utilización de la cepa de rotavirus mutante como aceptora de proteínas modificadas genéticamente, para descartar la posibilidad de que la mutación que confiere la termosensibilidad interfiera con las mutaciones o modificaciones a estudiar.

Los resultados de este trabajo muestran que es posible incorporar proteínas heterólogas, expresadas a partir de un plásmido, en partículas maduras de rotavirus, y esto abre la posibilidad de que se pueda realizar ensayos de genética reversa como una herramienta para conocer la estructura y función de las proteínas virales. En especial permitiría analizar mutaciones específicas y su repercusión en los procesos de infección, replicación y patogénesis de los rotavirus y otros miembros de la familia Reoviridae.

BIBLIOGRAFIA

Arias CF, Guerrero CA, Méndez E, Zárate S, Isa P, Espinoza R, Romero P and S López. 2001. Early events of rotavirus infection: the search for the receptor(s). In: Gastroenteritis viruses. Edited by Mary K. Estes. John Wiley and Sons, UK.

Bastardo JW, McKimm-Breschkin JL, Sonza S, Mercer LD, Holmes IH. 1981 Preparation and characterization of antisera to electrophoretically purified SA11 virus polypeptides. Infect. Immun. 34:641-647.

Beattie E, Kauffman EB, Martinez H, Perkus ME, Jacobs BL, Paoletti E, Tartaglia J. 1996. Host-range restriction of vaccinia virus E3L-specific deletion mutants. Virus Genes.;12(1):89-94.

Christensen ML. 1989. Human Viral Gastroenteritis. Clin. Microbiol. Rev. 2: No. 2 51-89.

Chen D, Burns JW, Estes MK and RF Ramig. 1989. Phenotypes of rotavirus reassortants depend upon the recipient genetic background. Proc. Natl. Acad. Sci 86:3743-3747.

Chen D, Estes MK and RF Ramig. 1992. Specific interactions between rotavirus outer capsid proteins VP4 and VP7 determine expression of a cross-reactive, neutralizing VP4-specific epitope. J. of Virol. Jan. 432-439.

Chen D, and RF Ramig. 1993. Rescue of infectivity by in vitro transcapsidation of rotavirus single-shelled particles. Virology 192:422-429.

Crawford SE, Labbe M, Cohen J, Burroughs MH, Zhou YJ, Estes MK. 1994. Characterization of virus-like particles produced by the expression of rotavirus capsid proteins in insect cells. J. Virol. 68(9):5945-22.

Elroy-Stein O and B Moss. 1990. Cytoplasmic expression system based on constitutive synthesis of bacteriophage T7 RNA polymerase in mammalian cell. Proc. Natl. Acad. Sci. 87:6743-6747.

Estes MK 1996. Rotavirus and their replication. In: Fields Virology 2:1625-1655. Edited by B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley, et al. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.

Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM and M Danielsen. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. Proc. Natl. Acad. Sci. 84:7413-7417.

Flint SJ, Enquist LW, Krug RM, Racaniello VR, Skalka AM. 2000. Virus cultivation, detection and genetics, In: Principles of virology molecular biology pathogenesis and control. ASM Press.

Fuentes-Panana EM, López S, Gorziglia M, and CF Arias. 1995. Mapping the hemagglutination domain of rotaviruses. J. Virol. 6:2629-2632.

Fuerst TR, Niles EG, Studier FW, and B Moss. 1986. Eucariotic transient-expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase. Proc. Natl. Acad. Sci. 83: p8122-8126.

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

Guerrant RL, Huges JM, Lima NL and J Crane. 1990. Diarrhea in developed and developing countries: magnitude, special settings and etiologies. Rev. Inf. Dis. 12:S41-S50

Guerrero CA, Mendez E, Zarate S, Isa P, López S and Arias CF. Integrin alpha(v) beta(3) mediates rotavirus cell entry. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Dec 19;97(26):14644-9.

Gilbert JM and HB Greenberg. 1997. Virus-like particle-induced fusion from without in tissue culture cells: role of outer-layer proteins VP4 and VP7. J. of Virol. 71(6):4555-4563.

Gombold JL and RF Ramig. 1987. Assignment of simian rotavirus SA11 temperature-sensitive mutant groups A, C, F, and G to genome segments. Virology. 161:463-473.

González RA, Espinosa R, Romero P, López S, Arias CF. 2000. Relative localization of viroplasmic and endoplasmic reticulum-resident rotavirus proteins in infected cells. Arch Virol 145(9):1963-73.

González SA and JL Affranchino. 1995. Assembly of double-layered virus-like particles in mammalian cells by coexpression of human rotavirus VP2 and VP6. J. Gen. Virol. 76:2357-2360.

Gorziglia MI and PL Collins. 1992. Intracellular amplification and expression of a synthetic analog of rotavirus genomic RNA bearing a foreign marker gene: mapping cis-acting nucleotides in the 3'-noncoding region. Proc Natl Acad Sci. 1;89(13):5784-8.

Greenberg HB, Valdesuso J, Van Wyke K, et al. 1983 Production and preliminary characterization of monoclonal antibodies directed at two surface proteins of rhesus rotavirus. J. Virol. 47:267-275.

Hawley-Nelson P, Ciccarone V, Gebeyehu, G And J Jessee. 1993. Lipofectamine reagent: a new, higher efficiency polycationic liposome transfection reagent. Focus 15: No 3 pp 73-79.

Hua J, Chen X and JT Patton. 1994. Deletion mapping of the rotavirus metalloprotein NS35 (NSP1): the conserved cysteine-rich region is essential for virus-specific RNA binding. J. Virol. 68(6):3990-4000.

Huang H, Schroeder F, Zeng C, Estes MK, Schoer JK, and JM Ball. 2001. Membrane interactions of a novel viral enterotoxin: rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4.. Biochem. 3;40(13):4169-80.

Isa P, López S, Segovia L and CF Arias. 1997. Functional and structural analysis of the sialic acid-binding domain of rotaviruses. J. Virol. 71:6749-6756.

Kaijot KT, Shaw RD, Rubin DH, and HB Greenberg. 1988. Infectious rotavirus enter cells by direct cell membrane penetration, not by endocytosis. J. virol. 62:1136-1144.

Kantharidis P, Dyall-Smith ML and HI Holmes. 1987. Marked sequence variation between segment 4 genes of human RV5 and simian SA11 rotaviruses. Arch. Virol. 93:111-121.

Kapikian AZ and RM Chanock. 1996. Rotaviruses. In: Fields Virology. 2:1657-1708. Edited by B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley, et al. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.

Mah DC, Leone G, Jankowski JM and PWK Lee. 1990. The N-terminal quarter of reovirus cell attachment protein σ 1 possesses intrinsic virion-anchoring function. Virol. 179, 95-103.

Maass DR and PH Atkinson. 1990. Rotavirus proteins VP7, NS28, and VP4 form oligomeric structures. J Virol Jun;64(6):2632-41.

Mattion N, Cohen J and MK Estes. 1994. "The rotavirus proteins" in: Viral infections of the gastrointestinal tract. pp 169-250 2nd ed. Edited by Albert Kapikian, Marcel Dekker. N. York Basel, Hong Kong.

Méndez E, Arias CF and S López. 1996. Interactions between the two surface proteins of rotavirus may alter the receptor-binding specificity of the virus. J. Virol. 70(2):1218-1222.

Méndez E, Arias CF and S López. 1993. Binding to sialic acids is not an essential step for the entry of animal rotaviruses to epithelial cells in culture. J. Virol. 67(9):5253-5259.

Miner JN and DE Hruby. 1990. Vaccinia virus: a versatile tool for molecular biologists. Tibtech. 8:20-25.

Moser C, Bernhardt G And A Buschauer. (1999). Efficient transfection of human endometrial cancer (HEC-1B) cells with FuGENE6 Transfection reagent. Biochemica. No 1 pp 26-27.

Moss B. 1996. Poxviridae: The viruses and their replication. In: Fields Virology 2:2637-2671. Edited by B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley, et al. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.

Newton K, Meyer JC, Bellamy R and JA Taylor. 1997. Rotavirus nonstructural Glycoprotein NSP4 alters plasma membrane permeability in mammalian cells. J. of Virol. 71(12):9458-9465.

Offit PA, Coupar BE, Svoboda YM, Jenkins RJ, McCrae MA, Abraham A, Hill NL and DB Boyle. 1994. Induction of rotavirus-specific cytotoxic T lymphocytes by vaccinia virus recombinants expressing individual rotavirus genes. Virology. 198:10-16.

Patton JT. 1994. Rotavirus replication. Curr. Topics in Microbiol. and Immunol. 185:107-127.

Piron M, Vende P, Cohen J and D Poncet. 1998. Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4GI and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F. EMBO J 17:19,5811-5821.

Prasad BV. 1988. Three-dimensional structure of rotavirus. J. Mol. Biol. 199:269-275.

Prasad BV, Burns JW, Marietta E, Estes MK and W Chiu. 1990. Localization of VP4 neutralization sites in rotavirus by three-dimensional cryo-electron microscopy. Nature. 343:476-479.

Ramig RF and RL Ward. 1991. Genomic segment reassortment in rotaviruses and other reoviridae. Advances in virus research. 39:163-207.

Ramig RF and JL Gombold. 1991. Rotavirus temperature-sensitive mutants are Genetically stable and participate in reassortment during mixed infection of mice. Virology. 182:468-474.

Ramig RF 1997. Genetics of the rotaviruses. Ann. Rev. Microbiol. 51:225-255

Ruggeri FM and HB Greenberg. 1991. Antibodies to the trypsin cleavage peptide VP8* neutralize rotavirus by inhibiting binding of virions to target cell in culture. J. Virology. 65:2211-2219.

Sabara M, Gilchrist JE Hudson GR Babiuk L.A. 1985. Preliminary characterization of an epitope involved in neutralization and cell attachment that is located on the major bovine rotavirus glycoprotein. J. Virology. 53: 58-66.

Shaw RD, Vo PT, Offit PA, Coulson BS And HB Greenberg. 1986. Antigenic mapping of the surface proteins of rhesus rotavirus. Virology. 155:434-51.

Spencer E, Arias ML. 1981. In vitro transcription catalyzed by heat-treated human rotavirus. J. Virology. Oct;40(1):1-10.

Taylor JA, Meyer JC, Legge MA, O'Brien JA, Street JE, Lord VJ, Bergmann CC and R Bellamy. 1992. Transient expression and mutational analysis of the rotavirus intracellular receptor: the C-terminal methionine residue is essential for ligand binding. J. of Virol. 66(6):3566-3572.

Ward RL, Knowlton DR, and HB Greenberg. 1988. Phenotypic mixing during coinfection of cells with two strains of human rotavirus. J. Virol. 62:4358-4361.

Wickner RB. 1993. Double-stranded RNA virus replication and packaging. J. Biol. Chem. 268: 3797-3800.

Zarate S, Espinosa R, Romero P, Méndez E, Arias CF and S. López. 2000. The VP5 domain of VP4 can mediate attachment of rotaviruses to cells. J. Virol. Jan;74(2):593-9.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA