

78



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE  
MÉXICO**

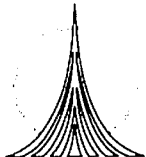
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**IDENTIFICACION DE REGIONES REACTIVAS A  
ANTICUERPOS MONOCLONALES EN LA PROTEÍNA  
NSP3 DE ROTAVIRUS**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO  
PRESENTADA POR:  
KEILI VIDAL ZAPATA**

**DIRECTOR DE TESIS:  
DR. LUIS PADILLA NORIEGA**



**FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES ZARAGOZA**

**MEXICO, D. F.**

**MAYO DEL 2002**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

*A ti Señor mi Dios que eres principio y fin en mi vida, tu amor ilimitado ha guiado mi caminar dando luz y esperanza en la oscuridad.*

*A mis Padres y hermanos...Ustedes han sido un valuarte en mi vida, una fortaleza en la cual puedo refugiarme en días de tormenta y ser feliz.*

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

*Doy gracias :*

*A mi Padre Celestial pues tu presencia me ha acompañado a lo largo del camino. No existen palabras suficientes para agradecerte lo que has hecho por mí pues ti eres el único y sabio Dios, por ti todas las cosas existen y fueron creadas.*

*A mis padres porque me ha enseñado lo mas valioso que pudiera aprender y han dado a mi vida la guía y la libertad para levantar las alas y volar...*

*A mis hermanos Noe, Neptali, Sara, Santiago, Salomón, Adán y Arelí ustedes han sido como el sol de la mañana que brinda calor, esperanza y vida. Gracias por su amor y su apoyo incondicional*

*A Dr. Padilla por su consejo y dirección pero sobretodo por buscar lo mejor de mi persona*

*A Claudio, Carolina, Mari Trini y Simón por su inapreciable ayuda, consejo, y asesoria pero especialmente por su amistad..... gracias*

*A mi familia porque cada uno de sus integrantes: primos, tíos y sobrinos, porque sus vidas ha enriquecido la mía de incontables maneras siendo un ejemplo constante en un mundo caótico.*

*A cada uno de mis amigos, los cuales han enriquecido mi vida con su amistad... Abraham, Marisol, Alex, Judit, Daniel, Héctor...entre muchos mas...*

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

*La percepción, sin comprobación ni fundamento, no es garantía suficiente de verdad.*

Bertrand Russell

*La clave esta en las proteínas que son las verdaderas maquinas de la vida y entender la estructura de cada una, es entender en qué consiste la vida.*

Max Perutz

*Toda nuestra ciencia, comparada con la realidad es primitiva e infantil... y sin embargo es lo más preciado que tenemos*

Albert Einstein

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

*El presente trabajo fue desarrollado en el laboratorio del Dr. Luis Padilla Noriega en el Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, de la Universidad Nacional Autónoma de México.*

*Este trabajo fue financiado parcialmente por los donativos 27849N y 33371N del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y contó con el apoyo del Programa de Becas para Tesis de Licenciatura en Proyectos de Investigación de la Universidad Nacional Autónoma de México.*

*Este trabajo contó con el apoyo técnico del Maestro en Investigación Biomédica Básica Simón Guzmán León.*

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

## Tabla de contenido

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. FUNDAMENTACIÓN TEORICA.....	2
Generalidades.....	2
Clasificación.....	3
Patogénesis.....	3
Epidemiología.....	4
Estructura de rotavirus.....	4
Proteínas virales.....	6
Ciclo de replicación viral.....	8
Proteína no estructural NSP3.....	9
Papel de NSP3 en la síntesis de proteínas celulares.....	11
Papel de NSP3 en la replicación del genoma.....	12
Anticuerpos.....	14
Anticuerpos monoclonales.....	15
Interacción antígeno-anticuerpo.....	17
Técnicas de biología molecular.....	19
Amplificación de ADN.....	19
Digestión de ADN.....	20
Traducción de proteínas <i>in vitro</i> .....	21
Electroforesis de proteínas.....	23
Inmunoprecipitación.....	24
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	26
IV. OBJETIVO GENERAL.....	27
V. OBJETIVOS PARTICULARES.....	27
VI. HIPOTESIS.....	27

VII. MATERIAL Y MÉTODOS.....	28
Material biológico.....	28
Reactivos.....	28
Equipo.....	29
Producción del virus.....	30
Electroforesis del ARN genómico de rotavirus.....	31
Obtención del ARNcd del rotavirus YM.....	31
Purificación del ARN de rotavirus YM en minicolumna RNeasy.....	32
Transcripción reversa del segmento 7 del rotavirus YM.....	33
Amplificación del segmento 7 del rotavirus YM.....	34
Purificación de ADN en minicolumna Wizard.....	35
Digestión del gen 7 del rotavirus YM.....	36
Purificación de los productos de digestión en gel de agarosa/ minicolumna QIA Quick o por minicolumna Wizard.....	37
Transcripción/traducción <i>in vitro</i> de la proteína NSP3.....	38
Producción de las proteínas NSP3 deletadas en el extremo carboxilo.....	40
Transcripción reversa para generar segmentos del gen 7 con deleciones en el extremo amino.....	40
Amplificación del gen 7 de rotavirus YM con deleciones en el extremo amino.....	42
Transcripción/traducción <i>in vitro</i> de las proteínas NSP3 truncadas en el extremo amino.....	44
Radioinmunoprecipitación de las proteínas NSP3.....	44
VIII. RESULTADOS.....	46
IX. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	61
X. CONCLUSIONES.....	64
XI. PERSPECTIVAS.....	65
XII. ANEXOS.....	66
XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72



## Lista de abreviaturas

ACM	anticuerpo monoclonal
ADN	ácido desoxiribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
ARNc	ARN complementario
ARNcd	ARN cadena doble
ARNm	ARN mensajero
BSA	albúmina de suero bovina
CAP	5- metil guanosina
cm	centímetros
DEPC	dietilpirocarbonato
dNTPs	desoxinucleótido trifosfato
DTT	ditrioreitol
eIF4A	factor de inicio de traducción eucariótica
eIF4E	factor de inicio de traducción eucariótica
eIF4G	factor de inicio de traducción eucariótica
Fab	fragmento del sitio de unión al anticuerpo
Fc	fragmento conservado
Kb	kilobases
KDa	kilodaltones
mg	miligramos
mL	mililitro
mM	milimolar
PABP	proteína de unión a poli A
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
RIPA	radioinmunoprecipitación
r.p.m.	revoluciones por minuto

<b>RT</b>	<b>transcripción reversa</b>
<b>SDS</b>	<b>dodecil sulfato de sodio</b>
<b>T<sub>m</sub></b>	<b>temperatura de fusión</b>
<b>UGACC</b>	<b>secuencia consenso de rotavirus grupo A</b>
<b>μCi</b>	<b>microCuries</b>
<b>μL</b>	<b>microlitro</b>
<b>μM</b>	<b>micromolar</b>

## INTRODUCCION

Los rotavirus pertenecen a la familia *Reoviridae* y son el principal agente etiológico de gastroenteritis severa en infantes menores de 5 años. Poseen 11 segmentos de RNAcd que codifican para 12 proteínas, seis de estas con funciones estructurales (VP1-VP4, VP6 y VP7) y seis con funciones no estructurales (NSP1-NSP6). La proteína NSP3 es codificada por el segmento 7 y se une al factor de inicio de traducción eIF4G, desplazando a la proteína celular PABP (proteína de unión a poly A) que normalmente se une a este factor y al extremo 3' de ARNm celular poliadenilado para estimular su traducción. NSP3 también es capaz de unirse al extremo 3' UGACC de los ARNm virales y estimular su traducción de manera análoga a la de PABP sobre ARNm celulares y simultáneamente es capaz de inhibir la síntesis de proteínas celulares gracias a su capacidad de desplazar a PABP de eIF4G. Así mismo NSP3 podría participar en la replicación de ARNm virales, los cuales sirven como moldes para la producción de ARNcd genómico y requieren de proteínas virales que pudieran "canalizarlos" hacia la replicación.

El objetivo del estudio fue determinar el efecto de una serie de deleciones en NSP3 del rotavirus YM sobre su reactividad con cinco anticuerpos monoclonales (AMC), por lo que se produjeron deleciones en los extremos amino y carboxilo por transcripción/traducción *in vitro*, las cuales se analizaron por radioinmunoprecipitación y electroforesis. Ninguna de las deleciones en el extremo carboxilo presentó reactividad con los AMC, siendo la mínima deleción de 68 aminoácidos. Entre las proteínas truncadas en el extremo amino el fragmento mínimo reactivo con los cinco AMC contiene los aminoácidos 182-313. Esta región mínima reactiva con los 5 AMC contiene al dominio de unión a eIF4G (aa 206- 313) pero carece del dominio de unión a ARN (aa 4-149) y de parte del dominio de dimerización (aa 150-206) por lo que el reconocimiento por los AMCs podría requerir de dos regiones distantes, el extremo carboxilo y la región de dimerización en la parte intermedia de la proteína *i.e.* los epítomos reconocidos por los 5 ACM anti-NSP3 son aparentemente conformacionales.

## FUNDAMENTACION TEORICA

### Generalidades

La gastroenteritis aguda es una de las enfermedades más comunes en el hombre y se estima que causa alrededor de 2.4 a 2.8 millones de muertes anuales (Bern *et al.*, 1992, Murray y López, 1997). Esta enfermedad es causada por bacterias, parásitos, virus y toxinas. Entre los agentes etiológicos virales se encuentran rotavirus, calicivirus, astrovirus y adenovirus, de los cuales rotavirus es el más importante (Kapikian *et al.*, 1993).

Los rotavirus se consideraban agentes patógenos de diarrea en ratones, simios y bovinos desde la década de los 50's pero no fue sino hasta 1973 que fueron implicados positivamente como causa de la gastroenteritis severa en humanos cuando Bishop y colaboradores usaron el microscopio electrónico para identificar al agente causal en biopsias duodenales de niños con gastroenteritis severa (Bishop *et al.*, 1973).

La infección con rotavirus también ocurre en otras especies como perros, gatos, ratones, ovejas, simios, felinos, etc. (Kapikian *et al.*, 2001). La Figura 1 muestra una reconstrucción de la imagen de rotavirus obtenida por microscopia electrónica (Prasad *et al.*, 1988, Yager *et al.*, 1994).



**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

Figura 1. Reconstrucción de imagen de la estructura tridimensional de rotavirus basada en microscopia electrónica (Prasad *et al.*, 1988).

## Clasificación

Los rotavirus son virus de doble cadena de ARN que se clasifican junto con otros ocho géneros dentro de la familia *Reoviridae* y constan de al menos siete grupos A-G que comparten antígeno de grupo (Kapikian *et al.*, 2001). En el grupo A se presentan al menos 4 subgrupos: I, II, I+II y noI-noII que dependen de la proteína VP6 (Greenberg *et al.*, 1983). Existen dos proteínas externas (VP4 y VP7) neutralizables por anticuerpos por lo que se ha propuesto una clasificación binaria, similar a la establecida para el virus de la influenza (Graham *et al.*, 1985), que consta de 15 diferentes serotipos específicos de VP7 llamados G1 a G15, por ser VP7 una glicoproteína, y 21 serotipos de VP4 llamados P1 a P21, por ser VP4 sensible a proteasas (Kapikian *et al.*, 2001).

## Patogénesis

La infección intestinal causada por rotavirus es más compleja de lo que inicialmente se pensaba ya que es afectada por una serie de factores del huésped y virales. Las células blanco de los rotavirus son enterocitos del intestino delgado y la diarrea puede ser causada por una serie de mecanismos incluyendo:

- ❖ Mala absorción como consecuencia de la destrucción de los enterocitos (Graham *et al.*, 1984).
- ❖ Activación del sistema nervioso entérico que provoca la liberación de un agente vasoactivo (Morris *et al.*, 2001).
- ❖ Secreción intestinal mediada por la proteína viral no estructural NSP4 la cual estimula la permeabilidad intestinal de  $Ca^{++}$  (Tian *et al.*, 1996) y altera la integridad celular epitelial (Newton *et al.*, 1997).

## **Epidemiología**

El grupo de edad más afectado por rotavirus es el de infantes menores de 5 años. En países templados se presentan un mayor número de casos en los meses de invierno (Brandt *et al.*, 1983) mientras que en países tropicales y subtropicales se presentan casos de infección en todas las estaciones del año (Cook *et al.*, 1990). En países en desarrollo se informan aproximadamente 125 millones de casos de diarrea anualmente de los cuales 18 millones van de moderados a severos y alrededor de 1 millón de niños muere por infecciones con rotavirus (Bern *et al.*, 1992).

Los rotavirus son transmitidos por la vía fecal-oral (Ward *et al.*, 1986) siendo el grupo A de rotavirus el epidemiológicamente importante, aunque se han presentado brotes infecciosos de diarrea en adultos causada por el grupo B en China (Su *et al.*, 1995) y se han documentado casos esporádicos de infección con el grupo C de rotavirus (Jiang *et al.*, 1995). Los serotipos específicos de rotavirus del grupo A que infectan a humanos varían con la época del año y la región geográfica incluyendo diferencias observadas en distintas latitudes (Koopmans *et al.*, 1999).

## **Estructura de los rotavirus**

Las partículas virales presentan tres capas proteicas concéntricas de simetría icosaédrica y no se encuentran envueltas en una membrana lipídica. Estas partículas poseen un diámetro aproximado de 102 nm incluyendo las espículas de VP4, que sobresalen de la superficie y 75 nm sin ellas. En la Figura 2 se muestra un corte trasversal de la partícula viral donde se observa la ubicación de distintas proteínas virales.

La capa proteica externa esta compuesta por 260 trímeros de VP7 y 60 espículas formadas por dímeros de VP4, la cual interactúa con VP7 y la proteína interna VP6.

La capa proteica intermedia consiste de 260 trímeros de VP6 (figura 2), los cuales son interrumpidos por 132 canales acuosos con tres diferentes formas en relación con la simetría de la cápside: 12 del tipo I, 60 del tipo II y 60 del tipo III. Los distintos canales permiten la importación de los metabolitos requeridos para la transcripción y la exportación de ARNm naciente, ya que la partícula viral con dos capas proteicas es capaz de transcribir el genoma viral (Lawton *et al.*, 1997). La capa interna esta compuesta por 120 moléculas de VP2. La parte interna de VP2 encapsida a las proteínas VP1, que es la ARN polimerasa dependiente de ARN (Valenzuela *et al.*, 1991) y VP3 que funciona como guanililtrasferasa (Liu *et al.*, 1992), así como al genoma que esta formado por 11 segmentos de ARN de cadena doble (ARNcd), de 3.3 a 0.6 Kb, con una totalidad de 18 Kb (Mattion *et al.*, 1996). Se ha demostrado que gran parte del ARNcd se encuentra organizado en estructuras dodecahédricas que están distribuidas alrededor de complejos de VPI-VP3 localizados en los vértices de simetría cinco, formados a su vez por cinco dímeros de VP2 (Prasad *et al.*, 1996).

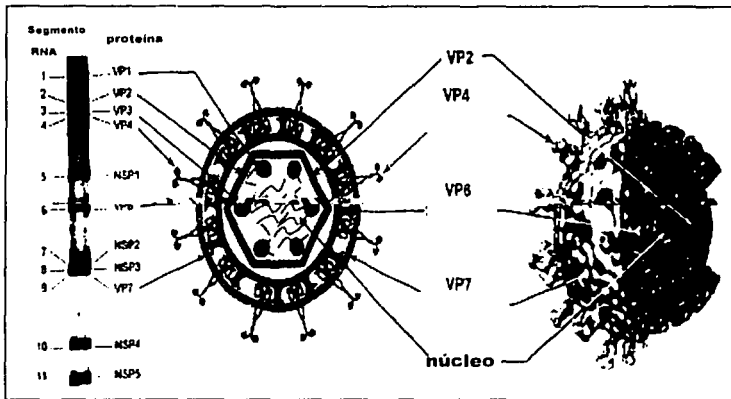


Figura 2. Separación electroforética de los 11 segmentos genómicos de rotavirus indicando las proteínas que codifican (izquierda). En el centro un corte transversal de la partícula viral y a la derecha una representación tridimensional del virus. (Tomado de Estes *et al.*, 2001)

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

## Proteínas virales

Los ARNm de rotavirus contienen regiones no traducibles (RNT) de longitud variable en sus extremos 5' y 3'. En el caso del grupo A, el extremo 5' posee una secuencia GGC y el extremo 3' la secuencia consenso UGACC conservada en los 11 genes, como se muestra en la Figura 3.

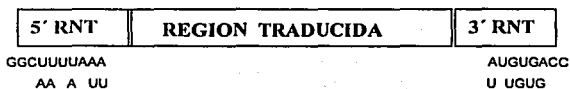


Figura 3. Organización de un segmento del genoma de rotavirus mostrando las regiones no traducibles, las secuencias consenso en los extremos 5' y 3' y la región intermedia que codifica para una proteína.

Los genes de rotavirus son monocistronicos es decir codifican para una proteína, con excepción del gen 11 que codifica para dos. Seis de los genes codifican para las proteínas estructurales: VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 y VP7 y cinco genes codifican para las proteínas no estructurales: NSP1- NSP6 (Mattion *et al.*, 1996).

Las proteínas estructurales son llamadas así porque se encuentran en las partículas virales maduras y poseen funciones relacionadas con la estructura del virión, replicación y patogenicidad viral, entre otras. Las proteínas no estructurales que se encuentran solo en células infectadas, poseen funciones en la replicación del genoma, traducción de ARNm y ensamble del virión. Las características generales de ambos grupos de proteínas se resumen en la tabla 1, aunque la función de algunas proteínas aún se desconoce.



Tabla 1. Características generales de la proteína de los rotavirus del grupo A.

Proteína	Segmento del genoma	Especificidad de unión a ARN	Sitio de acumulación	Comentarios
VP1	1	Extremo 3' del ARNm viral	Viroplasma	ARN polimerasa dependiente de ARN
VP2	2	No se une	Viroplasma	Requerida para la síntesis de ARNcd dentro del núcleo
VP3	3	Extremo 5' del ARNm viral	Viroplasma	Guanililtransferasa
VP4	4	No se une	Citoplasma	Proteína de superficie, hemaglutinina, patogenicidad
NSP1	5	Extremo 5' del ARNm viral	Citoesqueleto	Ligeramente básica, unión a zinc
VP6	6	No se une	Viroplasma	Proteína de la capa intermedia, forma trímeros
NSP3	7	Extremo 3' del ARNm viral	Citoesqueleto	Ligeramente ácida, forma dímeros
NSP2	8	No se une	Viroplasma	Básica, papel en la replicación de ARN, forma octámeros
VP7	9	No se une	RE	Glicoproteína de superficie, neutralización
NSP4	10	No se une	RER	Entero toxina, glicoproteína transmembranal
NSP5	11	Se une, especificidad no caracterizada	Viroplasma	Ligeramente básica, proteína cinasa
NSP6	11	No se sabe	Viroplasma	Fosfoproteína no estructural

## Ciclo de replicación viral

La replicación de rotavirus se lleva a cabo enteramente en el citoplasma. Al entrar el virus a la célula huésped pierde su capa proteica externa con lo que la transcriptasa viral se activa y sintetiza los ARN mensajeros con CAP en su extremo 5' pero no poliadenilados en su extremo 3'. Estos ARNm pueden ser traducidos o usados como moldes para la síntesis de ARNcd genómico, el que al ser encapsidado genera nuevas partículas virales. El modelo de replicación viral de acuerdo a Estes (Estes *et al.*, 2001) consiste de las siguientes etapas:

1. Adsorción del virus a los receptores celulares y entrada mediada por endocitosis o penetración directa, proceso por el cual se pierde la capa proteica externa. Algunos de los receptores o co-receptores podrían ser integrinas, gangliósidos GM3 o alguno otro no identificado. (Coulson *et al.*, 1997, Arias *et al.*, 2001).
2. Producción de ARN mensajero en el citoplasma por partículas virales bicapa (Clark *et al.*, 1980).
3. Traducción de los ARNm virales para producir las proteínas tanto estructurales como no estructurales (Lawton *et al.*, 2000).
4. Ensamble en regiones discretas del citoplasma llamadas viroplasmos de las partículas de una capa proteica formadas por VP2, VP1, VP3 y los 11 ARNm virales, los cuales son simultáneamente replicados por la ARN polimerasa (VP1) produciéndose ARNcd genómico. Posteriormente VP6 se une para formar partículas bicapa también en el viroplasma.
5. Maduración de las partículas tricapa al gemar las partículas al RER adquiriendo así una envoltura lipídica transitoria en la que se ubican VP4, VP7 y NSP4 (Stürzaker *et al.*, 1987 donde NSP4 actúa como receptor intracelular de estas partículas. Posteriormente la envoltura lipídica es removida resultando en virus maduro tricapa.
6. Liberación de partículas infecciosas (viriones) por lisis celular (Musalem *et al.*, 1985).

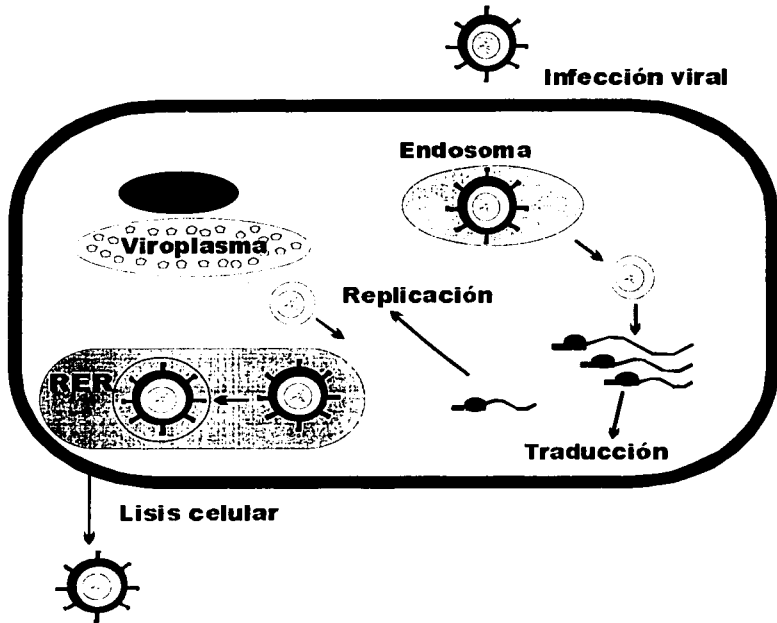


Figura 4. Esquema del ciclo de replicación de rotavirus propuesto por Estes *et al.*, (2001).

### Proteína no estructural NSP3

La proteína no estructural NSP3 de 315 aminoácidos es el producto del segmento genómico 7 del rotavirus YM. Se trata de una proteína ligeramente ácida de moderada abundancia en células infectadas (Ericson *et al.*, 1982) y distribuida en el citoplasma a manera de filamentos lo que sugiere una asociación con el

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

citoesqueleto (Greenberg *et al.*, 1999). El análisis de secuencia indica que se trata de una proteína predominantemente  $\alpha$ -helicoidal aunque estudios recientes han demostrado el extremo amino posee estructuras  $\alpha$ -hélice y  $\beta$ -plegada (Deo *et al.*, 2002).

Estructuralmente la proteína NSP3 posee varios dominios. El primero se trata de una región básica muy conservada de los aminoácidos 83-150 en la cual se predice una carga positiva neta de 10 a pH 7. Esta región precede a una región ácida entre los aminoácidos 150-169 (Figura 5). El segundo dominio consiste en dos regiones extendidas con secuencias hepta-repetidas (HR), las cuales son residuos hidrofóbicos espaciados cada siete aminoácidos. Las secuencias hepta-repetidas se encuentran ubicadas entre los aminoácidos 181-236 y 275-305, esta última región conforma un cierre de leucina. En las cepas de rotavirus que infectan a bovinos y simios existen 4 cisteínas altamente conservadas en las posiciones 123, 139, 306 y 310 (Both *et al.*, 1984, Qian *et al.*, 1991).

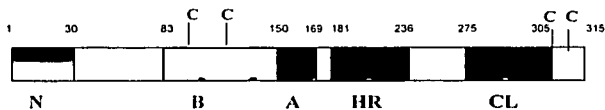


Figura 5. Estructura de la proteína NSP3. Se señalan las regiones: N, neutra; B, básica; A, ácida; HR, hepta-repetida; CL, cierre de leucina.

Funcionalmente la proteína NSP3 esta compuesta por 3 dominios (Figura 6) donde el dominio de unión a ARN está localizado entre los aminoácidos 4-149, el dominio de dimerización se ubica entre los aminoácidos 150-206 y el dominio de unión al factor de inicio de traducción en eucariontes eIF4G se localiza en los últimos 107 aminoácidos del extremo carboxilo (Piron *et al.*, 999).

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Figura 6. Representación de los dominios funcionales de la proteína NSP3

### **Papel de NSP3 en la síntesis de proteínas celulares**

La mayoría de los ARN eucarióticos se caracterizan por poseer una estructura 7-metil-G (5')ppp(5') N también llamada CAP donde N es cualquier nucleótido en el extremo 5', mientras que en el extremo 3' presentan poliadenilación consistente de aproximadamente 200 adeninas (Sachs *et al.*, 1993). Los ARNm de rotavirus en cambio presentan CAP en el extremo 5' (Imai *et al.*, 1985) pero no la estructura poli-A en el extremo 3', la cual es sustituida por la secuencia de 5 nucleótidos altamente conservados UGACC, que constituyen también el blanco reconocido específicamente por la proteína viral NSP3 (Poncet *et al.*, 1993).

De acuerdo con un modelo el inicio de la traducción eucariótica esta facilitado por la interacción entre el extremo 3'- poli A y el extremo 5' del ARN mensajero mediado por los factores de inicio de traducción eucariótica eIF4E, eIF4G y PABP (Figura 7a). Se ha demostrado que la proteína NSP3 de rotavirus funciona como un análogo de la proteína de unión a poli-A (PABP) en la traducción de ARNm virales (Figura 7d) (Michel *et al.*, 2000, Vente *et al.*, 2000). También se ha demostrado que NSP3 bloquea la unión de PABP con eIF4G y por lo tanto con la maquinaria de iniciación de traducción eucariótica (Figura 7b y c).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

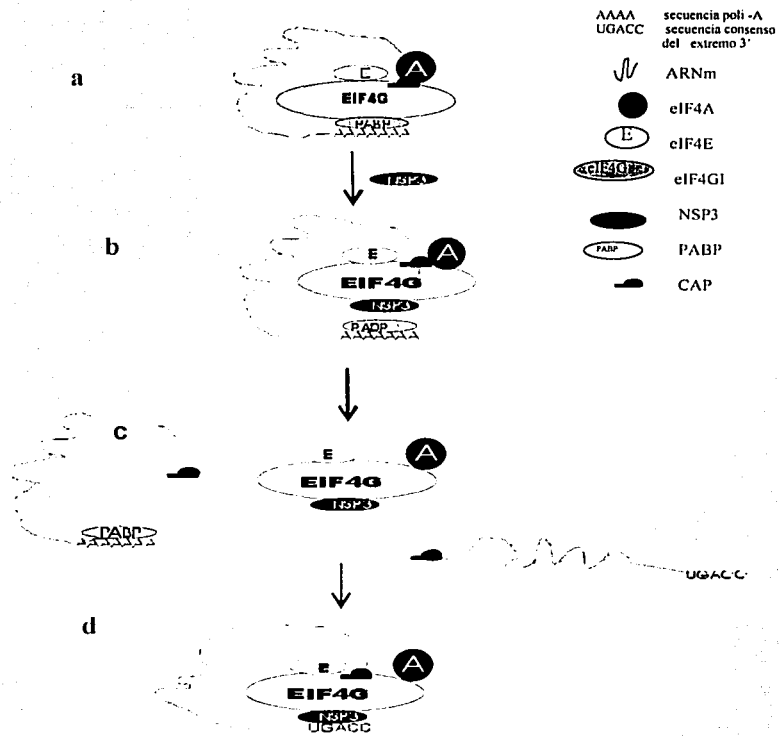


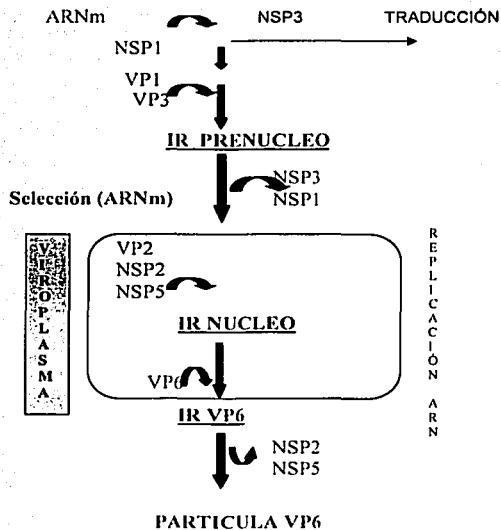
Figura 7. Modelo del inicio de traducción viral en células infectadas con rotavirus propuesto por Piron *et al.*, (1998).

**Papel de NSP3 en la replicación del genoma**

El reconocimiento del extremo 3' UGACC de los ARNm virales por NSP3 (Poncet, 1993) y el de una secuencia no identificada en el extremo 5' por NSP1 podrían ser importantes para la replicación del genoma viral, en la que los ARNm

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

funcionan como molde para la producción de ARNcd genómico (Patton, 1995). La proteína NSP3 se encuentra en altas concentraciones en el citoplasma y el complejo NSP3-ARNm posiblemente se une al citoesqueleto durante la replicación viral (Figura 8) lo que sugiere que NSP3 quizá en asociación con NSP1 participa en la translocación de los ARNm virales hacia el viroplasma (Israeli *et al.*, 1990). La asociación de VP1 y VP3 con el complejo NSP1/NSP3/ARNm (figura 8) constituye el intermediario de replicación IR PRENUCLEO, se ha propuesto que NSP1 y NSP3 podrían ser competitivamente desplazadas por VP3 y VP1 que se unen específicamente a los extremos 5' y 3' de los ARNm virales, es decir a los mismos blancos reconocidos por NSP1 y NSP3 (Gallegos *et al.*, 1989). El intermediario IR NUCLEO contiene a VP2 y podría resultar del movimiento del IR PRENUCLEO al viroplasma (Gonzalez *et al.*, 2000). En el viroplasma se seleccionan los distintos componentes del genoma viral y se ensamblan las proteínas estructurales del virión. La maduración del IR NUCLEO para convertirse en IR VP6 ocurre con el ensamble de VP6 sobre VP2 (Figura 8). La formación de partículas virales maduras resulta de la interacción de VP6 con VP4 que se ubica en el citoplasma, y con NSP4, localizada junto con VP7 en el retículo endoplásmico de la célula (Meyer *et al.*, 1989). El proceso de adquisición de la tercera capa proteica consiste en la gemación de partículas virales con dos capas proteicas al retículo endoplásmico y la posterior pérdida de la membrana lipídica resultando en viriones maduros con tres capas proteicas.



**TESIS CON FALLA DE ORIGEN**

**Figura 8.** Diagrama de las posibles interacciones secuenciales de las proteínas con capacidad de unión a ARN viral durante la replicación y encapsidación del genoma viral. Se subrayan los intermediarios de la replicación identificados, los cuales son complejos entre el ARN y proteínas virales específicas.

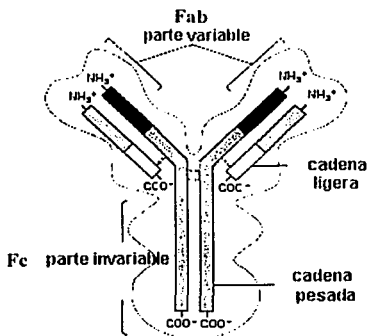
**Anticuerpos**

Los anticuerpos son proteínas producidas en respuesta a la presencia de moléculas, organismos u otros agentes externos en el cuerpo y son una de las respuestas clave del organismo como protección contra la acción de estos. Actualmente se ha manipulado la respuesta de los anticuerpos para producir una gran variedad de reactivos de afinidad para múltiples propósitos por ejemplo



anticuerpos específicos son usados para determinar la localización subcelular de un antígeno.

Estructuralmente los anticuerpos están compuestos por una o más copias de una unidad característica en forma de Y. Estas moléculas tienen tres regiones proteicas, dos de las cuales son idénticas y forman los "brazos" de la unidad característica como lo indica la Figura 9.



**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

Figura 9. Estructura de un anticuerpo donde se indica la composición del mismo. Fab es el fragmento del sitio de unión anticuerpo y Fc es el fragmento conservado.

La tercera región forma la base o tallo y es la que interactúa con los macrófagos o en la activación del complemento. Las dos regiones que contienen los sitios de unión antígeno- anticuerpo son conocidos como fragmento Fab (fragmento del sitio unión anticuerpo) y la región de regulación inmune es conocido como Fc (fragmento conservado). Cada inmunoglobulina contiene 4 polipéptidos (2 copias idénticas de un polipéptido de cadena pesada y 2 de cadena ligera). Una cadena ligera esta asociada con la región terminal amino de una cadena pesada para formar el dominio antígeno-anticuerpo.

Los anticuerpos se dividen en 5 clases (IgG, IgM, IgA, IgE e IgD) debido a los polipéptidos de cadena pesada que contienen. La secuencia proteica responsable de estas diferencias se encuentra en el fragmento Fc. Las diferentes clases también varían por el número de inmunoglobulinas, por ejemplo IgG contiene una unidad característica e IgM contiene cinco. La heterogeneidad de las regiones variables de estos tipos de cadena se debe principalmente al uso de segmentos de codificación múltiple, recombinación homóloga ligeramente inadecuada, generación de mutantes y asociación aleatoria de las cadenas.

### **Anticuerpos monoclonales**

Los anticuerpos policlonales o antisueros, son poblaciones complejas de anticuerpos, formadas por distintas clases de inmunoglobulinas en las que está presente una variedad de especificidades. Por el contrario, el término anticuerpo monoclonal (ACM) se usa para referirse a una población de moléculas de anticuerpos todas idénticas, las cuales poseen todas la misma especificidad.

En 1975, G. Kohler y C. Milstein demostraron la posibilidad de producir ACM mediante la fusión de linfocitos B con células de mieloma (células tumorales inmortales). Ellos demostraron que los híbridos resultantes de tal fusión heredan la capacidad para crecer indefinidamente en cultivo y para producir anticuerpos, y que, además, es posible aislar del producto heterogéneo de fusión; aquellos híbridos secretores del anticuerpo en el cual se está interesado (Kohler *et al.*, 1975) La técnica original descrita por Kohler y Milstein (Figura 10) permite la obtención de ACM de ratón. El proceso se inicia con la inmunización de ratones de laboratorio con el antígeno para el cual se desea producir los anticuerpos. Una vez que se tiene la certeza del estado inmune de estos animales (por lo general se establece tomando muestras de sangre y examinando y/o cuantificando la presencia de anticuerpos específicos en el suero inmune), los mismos son sacrificados y se obtiene el bazo, en el cual se encuentra una población numerosa de linfocitos B. A continuación, las células de bazo se fusionan con células de

mieloma inmortales que son mantenidas en el laboratorio en la forma de líneas celulares. La fusión, fenómeno poco común en células somáticas, es facilitada mediante la adición de agentes virales, químicos o físicos de los cuales el más usado es polietilenglicol (PEG). El producto de la fusión entre una célula de bazo y una célula de mieloma es denominado hibridoma. Los hibridomas heredan características fenotípicas de ambas células parentales de manera tal que son capaces de crecer indefinidamente y de producir el anticuerpo codificado en los genes del esplenocito padre. La población de hibridomas obtenida mediante una fusión, es heterogénea en cuanto a los anticuerpos secretados por ella. Para seleccionar los híbridos productores del anticuerpo de interés se realiza clonación celular.

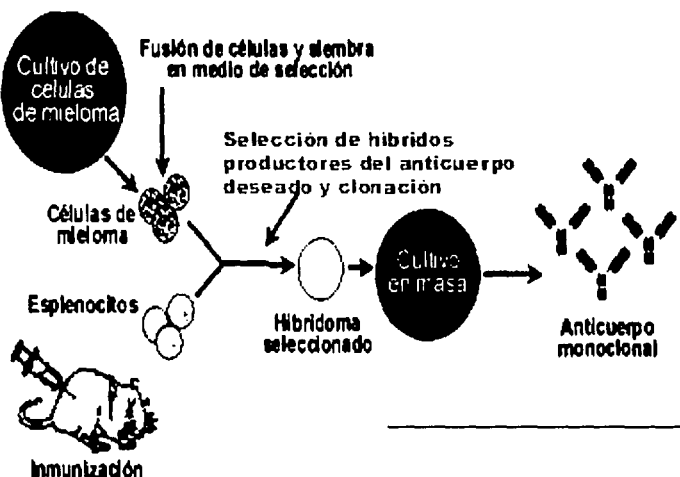


Figura 10. Producción de un anticuerpo monoclonal

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Esta clonación consiste en sembrar los hibridomas en microcultivos a una densidad celular tan baja que se garantiza que las células integrantes de la población obtenida en cada microcultivo sean todas idénticas. Los anticuerpos secretados por estas poblaciones clonales de hibridomas son anticuerpos monoclonales.

Los ACM son sustancias químicamente bien definidas, su naturaleza y estructura se conoce en detalle lo que permite la formulación de preparaciones estables y facilita los procedimientos para su conjugación a trazadores tales como sustancias fluorescentes, enzimas, radioisótopos, oro coloidal, etc. además son reactivos susceptibles de ser preparados en forma pura, en condiciones muy controladas y en grandes cantidades.

### **Interacción antígeno- anticuerpo**

La región del antígeno que interactúa con el anticuerpo está definido como epítipo. Un epítipo no es una propiedad intrínseca de alguna estructura en particular y es definido sólo como referencia al sitio de unión del anticuerpo. El tamaño del epítipo es determinado por el tamaño del sitio recombinante, aunque se trata de pocos aminoácidos de la cadena que entran en contacto con el antígeno. Funcionalmente existen dos clases de epítipos: epítipos lineales y epítipos conformacionales (Figura 11). Los epítipos lineales son una secuencia de péptido lineal de 5-20 aminoácidos y los epítipos conformacionales están formados por doblamientos de la proteína en largos dominios proteicos, ya que se encuentran cercanos en la conformación de la proteína pero separados en la secuencia lineal (Mackow *et al.*, 1998).

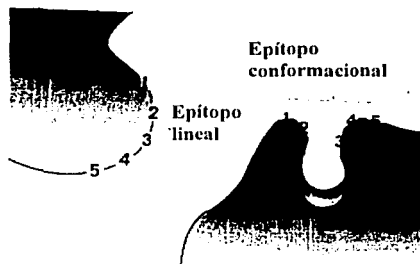


Figura 11. Epítopos lineales conformacionales

La interacción antígeno-anticuerpo es totalmente dependiente de interacciones no covalentes y el complejo formado se encuentra en equilibrio con los componentes libres. Estas interacciones incluyen puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, interacciones hidrofóbicas y coulombicas. La interacción es un balance de interacciones de atracción y repulsión por lo que pequeños cambios en la estructura del antígeno pueden afectar profundamente la fuerza de esta interacción (Mackow *et al.*, 1998).

### Mapeo de epítopos

El mapeo de epítopos se utiliza para estudiar algunas propiedades de los sitios de unión a proteínas modificadas, el origen de fragmentos proteicos, orientación de las proteínas en la membrana celular, la especificidad de la respuesta inmune, etc. Existen diversos métodos para realizar el mapeo de epítopos, uno de los más usados está basado en la fragmentación de la proteína y el análisis de cada fragmento con el anticuerpo. Históricamente estos fragmentos son producidos usando compuestos químicos o por cortes con proteasas, actualmente existen

sistemas de expresión de proteínas recombinantes en los cuales el marco abierto de lectura es fragmentado aleatoria o específicamente. La versatilidad de los protocolos de fragmentación de ADN permiten un número de variantes muy grande y casi todas estas variantes son efectivas porque solo se necesita una pequeña porción de la proteína para determinar si el anticuerpo se une. Un ejemplo de estas variantes es producir fragmentos de ADN por la reacción de polimerasa en cadena y traducirlos en un sistema *in vitro* en presencia de aminoácidos radioactivos (Mackow *et al.*, 1998).

### **Técnicas de biología molecular**

Entre los aspectos fundamentales a conocer en el desarrollo del proyecto se encuentran las bases de las técnicas de biología molecular útiles para alcanzar los objetivos del proyecto, como la reacción de la polimerasa en cadena, digestión con enzimas, transcripción/traducción *in vitro*, entre otras que ha continuación se describen.

### **Amplificación de ADN**

Para la amplificación de ADN se utiliza la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) a través de una serie de ciclos repetitivos formados por tres pasos (Figura 12). El primer paso es la desnaturalización por calor del ADN de interés sea de origen bacteriano, viral u otra fuente. Después de desnaturalizado el ADN, se realiza la separación física de las dos cadenas incubando la muestra a temperaturas entre 93–97°C. Estas permanecerán separadas libres en la solución hasta que la reacción se enfría de 35–50°C para permitir que los "cebadores" o "sondas" que son secuencias específicas complementarias que se añaden a la reacción se unan a las secuencias blanco y se realice la hibridización (Figura 12c). El tercer paso consiste en la polimerización, elongación o extensión del complejo

(sondas + ADN) por la acción de la enzima ADN polimerasa (Figura 12d). Estos cambios cíclicos de temperatura son repetidos un gran número de veces para obtener un gran número de copias (Figura 12e).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

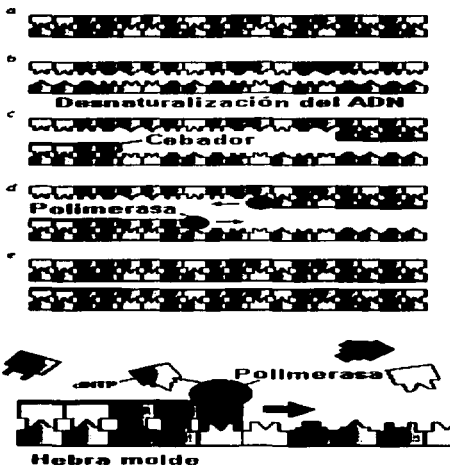


Figura 12. Etapas de la reacción de la polimerasa en cadena donde: *a* indica ADNdc ; *b*, indica la etapa de desnaturalización; *c*, indica la etapa de alineamiento; *d*, indica la etapa de elongación; *e*, esquematiza el ADN amplificado.

### Digestión de ADN

La digestión de ADN con enzimas de restricción también conocidas como endonucleasas de restricción produce fragmentos de ADN con diferentes

longitudes. En 1968 Arber y Linn (Linn *et al.*, 1968) demostraron la actividad de endonucleasa de restricción de *EcoB*, comprobando que estas enzimas cortan el ADN de otros organismos pero no el del microorganismo del que procede. Las enzimas de restricción reconocen sitios específicos con base en su composición y longitud, el sitio típico reconocido es un palíndromo de 4, 5, 6, 7 u ocho pares de bases por ejemplo *EcoR1* reconoce el sitio GAATTC. El palíndromo puede ser interrumpido por una serie de 1 a 9 nucleótidos de bases inespecíficas, por ejemplo *Sfi I* reconoce el sitio GGCCNNNNNGGCC donde N puede ser cualquier base. Algunas enzimas no requieren un sitio de reconocimiento en palíndromo y típicamente cortan ADN de un determinado número de bases de una cadena, por ejemplo *Mbo II* corta en el sitio 5'... GAAGA...3'.

Los sustratos comúnmente usados para la digestión con enzimas de restricción incluyen ADN de plásmidos, ADN genómico y ADN del bacteriófago lambda los cuales deben tener un alto grado de pureza porque la presencia de nucleasas, sales y otros tipos de ADN pueden producir digestiones incompletas o degradaciones.

### **Traducción de proteínas *in vitro***

Los sistemas de síntesis de proteínas libres de células permiten la expresión de proteínas *in vitro* de genes clonados que tienen una gama de aplicaciones como su caracterización funcional, estudios de interacción proteína-proteína, proteína-ADN, proteína-ARN y análisis con proteínas truncadas.

Existen varios sistemas de traducción *in vitro* derivados de procariontes los cuales usan *E. coli* con promotores T7 y S30 mientras que los sistemas derivados de eucariontes se basan en el uso de lisado de reticulocitos o extractos de germen de trigo con promotores SP6, T7 o T3.

El proceso de síntesis de proteínas *in vitro* consta de varios pasos donde primero la secuencia codificante es amplificada conteniendo el promotor de las ARN polimerasas SP6 o T7. Posteriormente el ARNm que codifica para la



proteína es generado al transcribir el molde con una ARN polimerasa apropiada. Por último el ARNm es traducido *in vitro* en un extracto de germen de trigo o lisado de reticulocitos los cuales contienen los componentes celulares necesarios para la síntesis proteica ARNt, ribosomas, aminoácidos, factores de inicio, elongación y terminación (Promega, 1996).

La producción de proteínas *in vitro* puede ser monitoreada usando algún aminoácido radioactivo adicionado a la reacción el cual es detectado por autorradiografía, alternativamente hay métodos de detección no radioactivos como la inmunoprecipitación directa.

### **Electroforesis de proteínas**

La electroforesis es usada para separar mezclas de proteínas, determinar la composición de una muestra o verificar homogeneidad entre muestras. En un gel de poliacrilamida las proteínas migran en respuesta a un campo eléctrico a través de un soporte gelificado. La combinación del tamaño de poro en el gel, la carga, tamaño y forma de la proteína determina la velocidad de migración de cada muestra. Existen varios métodos de separación electroforética pero el de mayor uso es en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS). En esta técnica la muestra es desnaturalizada y recubierta con SDS lo cual da una carga negativa proporcional a la longitud de la cadena peptídica. La muestra es colocada en un gel de poliacrilamida y un alto voltaje es aplicado causando que los componentes proteicos migren hacia el cátodo ya que las proteínas poseen carga negativa en proporción a su tamaño, por lo que son separadas con base en su peso molecular, el cual puede ser estimado por comparación de la movilidad en un gel por bandas con proteínas estándares. Cada una de las bandas individuales pueden ser visualizadas y recobradas por difusión pasiva en gel o electroelución. Los métodos comúnmente utilizados para el revelado del gel son azul de Coomassie y tinción con plata por la simplicidad de su uso y porque las bandas puedan ser recobradas para un análisis posterior.

## Inmunoprecipitación

La inmunoprecipitación consiste en la formación del complejo antígeno-anticuerpo unido a una matriz sedimentable. La inmunoprecipitación permite determinar el peso molecular relativo de proteínas, la velocidad de degradación de la misma, analizar interacciones proteína-proteína, monitorear modificaciones postraduccionales y analizar actividades enzimáticas asociadas o intrínsecas.

La inmunoprecipitación consta de tres etapas de manera general (Figura 13) en donde en la etapa 1 el antígeno es solubilizado por diversas técnicas. En la etapa 2 el anticuerpo específico es unido covalentemente a proteína A o G las cuales interactúan específicamente con regiones conservadas de los anticuerpos y están unidas a una matriz sedimentable usualmente pequeñas perlas de agarosa o Sefarosa (Amersham Pharmacia, Suecia). En la última etapa se incubaba el antígeno con el anticuerpo inmovilizado formando un complejo inmovilizado de antígeno- anticuerpo. El análisis de este complejo se puede realizar por autorradiografía al adicionar un aminoácido radioactivo que generalmente es metionina marcada con  $^{35}\text{S}$ .

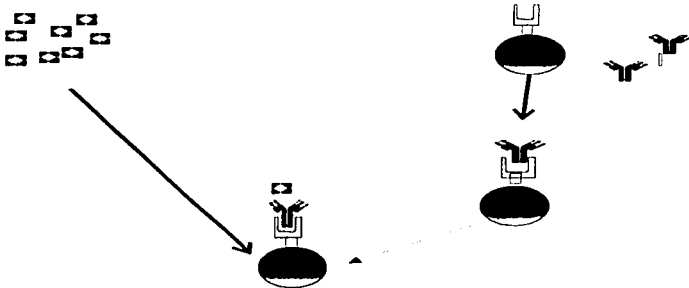


Figura 13. Esquema de las etapas de la inmunoprecipitación donde:  $\blacktriangle$  antígeno,  $\bullet$  Sefarosa,  $\cup$  proteína A y  $\Upsilon$  el anticuerpo.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

En la inmunoprecipitación se utilizan 3 tipos de anticuerpos: policlonales, monoclonales y un grupo de anticuerpos monoclonales las características generales de estos tipos están descritas en la tabla No.3. El tipo de anticuerpo a utilizar depende considerablemente del objetivo de la inmunoprecipitación así como de los recursos disponibles.

Tabla 2. Características de los anticuerpos usados en radioinmunoprecipitación.

Características	Anticuerpos policlonales	Anticuerpos monoclonales	Grupo de anticuerpos Monoclonales
Intensidad de la señal	Excelente	Variable	Excelente
Especificidad	Usualmente buena con cierto fondo	Excelente, aunque puede haber reacciones cruzadas	Excelente porque evita las reacciones cruzadas
Ventajas	Estable, interacciones multivalentes	Especificidad Cantidad ilimitada	Estable, interacciones multivalentes, especificidad
Desventajas	Fondo considerable	Necesita alta afinidad por el antígeno	No son disponibles comúnmente

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los rotavirus son agentes etiológicos de gastroenteritis aguda en niños menores de 5 años y se calcula que causan alrededor de un millón de muertes anuales en países en vías de desarrollo, también infectan a animales de importancia económica.

Aunque se conocen parte de las características morfológicas, inmunológicas, etc. del virus aun no se comprenden totalmente aspectos fundamentales en el ciclo de replicación viral, en la función de las proteínas no estructurales que se unen al ARNm, etc. El desarrollo de vacunas o tratamientos médicos eficaces para combatir la gastroenteritis causada por rotavirus depende en gran manera en comprender primero la función de las proteínas virales en procesos como la replicación del genoma viral, inmunidad, patogenicidad, etc. En el proyecto se estudia a la proteína no estructural NSP3, estudios recientes indican que esta proteína juega un papel clave en el ciclo replicativo del genoma y en la inhibición de la síntesis de proteínas celulares por lo que en este trabajo se pretende que la identificación de las regiones mínimas de la proteína NSP3 que reaccionan con anticuerpos monoclonales (ACMs) contribuya de manera indirecta al conocimiento de la estructura tridimensional de la proteína, ya que la presencia de epítopos lineales en NSP3 permitirá que fragmentos pequeños sean reconocidos por los ACMs anti-NSP3 mientras que estos anticuerpos solo reconocerán fragmentos grandes si los epítopos son de naturaleza conformacional. Por otra parte la identificación de regiones reconocidas por los anticuerpos monoclonales permitirá utilizar a estos anticuerpos como herramientas en el estudio de las funciones de la proteína no estructural NSP3 en estudios posteriores.

## OBJETIVO GENERAL

Identificar por medio de radioinmunoprecipitación (RIPA) los fragmentos mínimos de la proteína no estructural NSP3 de rotavirus necesarios para reaccionar con cinco anticuerpos monoclonales produciendo los fragmentos proteicos por transcripción y traducción *in vitro*.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Producir y purificar el ARN genómico de rotavirus
- Clonar el gen que codifica a NSP3 de rotavirus en el contexto apropiado para su expresión a partir del promotor de la RNA polimerasa T7.
- Obtener fragmentos proteicos con deleciones en los extremos amino y carboxilo de la proteína NSP3 por transcripción y traducción *in vitro*.
- Realizar radioinmunoprecipitaciones de los fragmentos producidos de la proteína NSP3 con cinco anticuerpos monoclonales.

## HIPOTESIS

Los anticuerpos monoclonales anti-NSP3 de rotavirus YM solo reconocerán fragmentos grandes de la proteína NSP3 de rotavirus YM, debido a la naturaleza conformacional de los epitopos presentes en ella.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Material biológico

- Células de riñón de mono, cepa MA104 (cepa procedente del laboratorio del Dr. L. Padilla en el Instituto de investigaciones Biomédicas, UNAM).
- Rotavirus cepa YM (cepa procedente del laboratorio del Dr. L. Padilla en el Instituto de investigaciones Biomédicas, UNAM ).

### Reactivos

- Albúmina de suero bovino. SIGMA, EUA
- Anticuerpos monoclonales anti-NSP3: PNS31, PNS32, PNS34, PNS35 , PNS36 y suero hiperinmune anti-NSP3 producidos en el laboratorio usando la proteína NSP3 fusionada a Glutación S-transferasa expresada en *E. coli* como antígeno para inmunizar ratones. Los anticuerpos monoclonales se seleccionaron por inmunotinción de células MA104 infectadas con rotavirus YM
- Anticuerpo monoclonal IE11 contra la proteína VP6 de rotavirus, producido por L. Padilla en el laboratorio del Dr. H. Greenberg (Universidad de Stanford, EUA) a partir de un ratón inmunizado con el rotavirus de humano ST3 y seleccionado por un ensayo inmunoenzimático contra el rotavirus de humano Wa
- Cocktail inhibidor de proteasas Complete (No. catálogo 1697498) ROCHE, ALEMANIA
- ADN polimerasa Elongasa. ROCHE, EUA
- Enzimas de restricción Bcl I y BstN I. NEW ENGLAND BIOLABS, EUA
- Enzimas de restricción Xba I y Bgl II. ROCHE, EUA
- Isopropanol grado HPLC. BURDINCK & JACKSON, EUA
- Marcadores de peso molecular con C<sup>14</sup>. AMERSHAM PHARMACIA, REINO UNIDO

- Marcadores de peso molecular de 1 Kb. ROCHE, EUA.
- Marcadores de peso molecular de 100 Pbs. ROCHE, USA
- Medio mínimo esencial de Eagle. ROCHE, USA
- Metionina S<sup>35</sup> Redivue grado traducción. AMERSHAM PHARMACIA, REINO UNIDO
- Oligonucleotidos YMT75, YMX3, YMT731, YMT781, YMT7150, YMT7182 . ROCHE, EUA
- Película autoadherente Kleen Pack. KINMBERLY CLARCK, EUA
- Proteína A- sefarosa. SIGMA, SUECIA
- ARN Polimerasa ThermoScript. ROCHE, NUEVA ZELANDA
- Sistema ThermoScript para RT-PCR. ROCHE, REINO UNIDO
- Sistema de purificación de ARN por minicolumna RNAeasy. QIAGEN, ALEMANIA
- Sistema de purificación de ADN por minicolumna Wizard. PROMEGA, EUA
- Sistema de transcripción/traducción TNT T7 Quick Master. PROMEGA, EUA
- Sistema de transcripción/traducción TNT T7 para ADN obtenido por PCR. PROMEGA, EUA

### **Equipo**

- Agitador mecánico Belly Dancer. STOVALL
- Agitador mecánico modelo vórtex Genie 2. VWR SCIENTIFIC
- Analizador de imágenes Fluor-S. BIORAD
- Analizador de imágenes FX. BIORAD
- Balanza analítica modelo SA 210 D. SCIENTECH
- Bomba de vacío DOA 421-AA. PALL
- Cámara de electroforesis Hoefer, modelo SA 600. AMERSHAM PHARMACIA
- Cámara de electroforesis, modelo Horizon 58. LIFE TECHNOLOGIES
- Cassete BSA 4043 para detección de imágenes radioactivas. FUJI FILM

- Centrifuga modelo Eppendorf 5415C. BRINKMANN INSTRUMENTS
- Fuente de poder para electroforesis, modelo EPS 600. PHARMACIA BIOTECH
- Gabinete de seguridad biológica, clase II A/33. FORMA SCIENTIFIC
- Incubadora con humedad y atmósfera de CO<sub>2</sub> controlada modelo 3110. FORMA SCIENTIFIC
- Microscopio invertido modelo TMS-F 210999. NIKON
- Placa de agitación, modelo Cimerec 2. THERMOLINE
- Potenciómetro modelo 320. CORNIG
- Secador de geles modelo FB6D 45. FISHER SCIENTIFIC
- Termociclador modelo 2400. PERKIN ELMER

## **Metodología**

### **Reactivos**

La composición de los reactivos utilizados en la metodología se describe en el anexo D.

### **Producción del virus**

Para la producción de rotavirus YM se cultivó la línea celular MA-104 de células fetales de riñón de mono usando medio mínimo esencial de Eagle (MEM) con suero fetal bovino (SFB) al 10 % y se incubaron a 37°C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Las células confluentes obtenidas en frascos F175 (Costar) fueron lavadas 2 veces con MEM sin SFB previamente a la infección. El virus se activó con tripsina [10 µg/mL final] colocando en un tubo Falcon: 2.5 mL de virus YM y 12.5 µL de tripsina [2 mg/mL], se mezcló suavemente y se incubó a 37°C por treinta minutos. Para la infección de las células confluentes a cada frasco F175 conteniendo 24.5 mL de MEM s/SFB y 10µL de tripsina [2 mg/mL] se le adicionaron 0.5 mL del virus activado, obteniendo así una concentración final de 1 µg/mL de tripsina. Las células se incubaron a 37°C y 5 % de CO<sub>2</sub> hasta que



se observó un efecto citopático en las mismas (usualmente 48 horas). El virus producido se cosechó sometiendo a las células a tres ciclos de congelación/descongelación para obtener un lisado celular el cual se colectó y almacenó en alícuotas de 30 mL.

### **Electroforesis del ARN genómico de rotavirus**

Se detectó el patrón electroforético del ARNcd de rotavirus por electroforesis y tinción con nitrato de plata. Primero se extrajo el ARNcd de los viriones presentes en el lisado de células infectadas por el método de fenol/cloroformo. Se mezclaron 200  $\mu$ l del lisado de celular, 50  $\mu$ l de amortiguador disruptor 5X, 200  $\mu$ L de fenol saturado y 200  $\mu$ L de cloroformo, la mezcla se agitó en vórtex moderado por dos minutos y se centrifugó a 12 000 r.p.m. durante cinco minutos en microcentrífuga Eppendorf. En este paso se forman dos fases, la fase acuosa (parte superior) en la que se encuentran los ácidos nucleicos, una interfase que contiene proteínas y la fase orgánica. De la fase acuosa se tomaron 90  $\mu$ l y se transfirieron a un tubo de microcentrífuga de 0.6 mL ó a una placa de 96 pozos y se adicionaron 10  $\mu$ l de azul de bromofenol al 1% en glicerol al 50 %. El análisis electroforético se realizó en gel de 0.75 mm de espesor de poliacrilamida al 12 % usando buffer Laemli 1 X en cámara Hoefer a 6.3 mA durante 15 horas (95 mA/hora final). El gel se tiñó colocándolo en una solución fijadora de etanol 10 %-ácido acético 0.1 % durante 30 minutos con agitación suave y posteriormente se transfirió a una solución de nitrato de plata al 0.18 % durante 30 minutos también en agitación constante. El gel se lavó brevemente con agua dos veces y se sumergió en 200 mL de solución reveladora de formaldehído 0.8 % - hidróxido de sodio 3 % hasta que se observo un patrón de bandas característico de rotavirus. La reacción se detuvo retirando la solución reveladora y adicionando ácido acético al 5 %.

### **Obtención de ARNcd del rotavirus YM**

Para obtener el ARN del rotavirus YM, las partículas virales se semipurificaron por centrifugación diferencial y se extrajo el ARNcd genómico por cloroformo-fenol-SDS. A una alícuota de 30 mL del lisado celular se le adicionaron 10 mL de triclorofluoroetano, esta mezcla se homogenizó agitando vigorosamente en vórtex por 30 segundos. Para precipitar el desecho celular la mezcla se centrifugó a 5000 r.p.m por 20 minutos en un rotor Beckman JA20. El sobrenadante se transfirió a tubos Ultra-Clear (Beckman) de 5 mL c/u y se ultracentrifugó a 25 000 r.p.m durante 90 minutos a 4°C en rotor SW55 a 4°C y se resuspendió el botón conteniendo el virus en 150 µL de agua destilada estéril por cada tubo. Para extraer el genoma viral a 200 µL del virus (producto de la ultracentrifugación) se le adicionaron 50 µL de buffer disruptor 5x, se mezcló suavemente con micropipeta y se le adicionaron 200 µL de fenol y 200 µL de cloroformo, agitando la mezcla 2 minutos en vórtex moderado. Se centrifugó a 12 000 r.p.m durante 5 minutos en microcentrifuga Eppendorf y se recuperó la fase acuosa que contenía el genoma viral cuidando de no tomar la interfase. Se midió el volumen del ARNcd obtenido y se almacenó a -20 °C.

### **Purificación del ARN de rotavirus YM en minicolumna RNeasy (Qiagen)**

El ARNcd genómico de rotavirus se purificó por extracción con fenol/cloroformo y por su afinidad a las columnas RNeasy. Los reactivos fueron proporcionados por el fabricante (Qiagen). En un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL se colocaron: 100 µL de virus YM, 100 µL de fenol y 100 µL de cloroformo, esta mezcla se agitó por 1 minuto en vórtex moderado y se centrifugó por 3 minutos a 12 000 r.p.m. en microcentrifuga Eppendorf. La fase acuosa que contenía el genoma viral se colectó (este paso se repitió para reunir el genoma viral en un tubo). A 100 µL de la fase acuosa se añadieron 350 µL de amortiguador de lisis RLT (conteniendo 10 µL de β-mercaptoetanol por cada mL de amortiguador) y 250 µL de etanol absoluto. Esta mezcla (700 µL) se

deposito lentamente con la ayuda de una jeringa en una minicolumna RNeasy (la cual estaba sobre un tubo de recolección de 2 mL) y se centrifugó por 15 segundos a 10 000 r.p.m. en microcentrífuga Eppendorf, desechando el líquido ya que el genoma viral se adsorbe a la resina de la minicolumna. Para lavar la minicolumna esta se transfirió a un tubo de recolección de 2 mL, se añadieron 500 µL de amortiguador RPE y se centrifugó por 15 segundos a 10 000 r.p.m. En un segundo lavado se colocaron 500 µL de amortiguador RPE sobre la columna y se centrifugó por 2 minutos a 14 000 r.p.m. para secar la membrana. La minicolumna se transfirió a un tubo de recolección de 1.5 mL y se añadieron 30 µL de agua destilada libre de RNAsas sobre la membrana incubando 2 minutos a temperatura ambiente y recuperando el genoma viral por centrifugación a 10 000 r.p.m. durante un minuto. El ARN purificado se analizó corriendo 5 µL en un minigel de agarosa al 1 % en amortiguador TAE 1x a 100 V durante 1 hora en cámara Horizon 58, incluyendo como control 500 ng de marcador de peso molecular de 1 Kb.

#### **Transcripción reversa del segmento 7 del rotavirus YM**

El diseño de los oligonucleótidos utilizados para la transcripción reversa y la amplificación del segmento 7 de rotavirus YM se basó en la secuencia del gen 7 del rotavirus YM (anexo A) proporcionada por la Dra. Susana López (Instituto de Biotecnología, UNAM) usando el programa DNAMAN. Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos sintetizados por Roche:

- YMT75 (secuencia 5' a 3'): CAA TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA TGG AGT CTA CTC AGC. Este oligonucleótido contiene la secuencia del promotor modificado de la polimerasa T7 (TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA TG) necesario para la transcripción/traducción *in vitro*. En esta secuencia los dos últimos nucleótidos del promotor T7 (GA) se cambiaron por (TG) para generar el codón de inicio ATG. El oligonucleótido también contiene la secuencia inicial del gen 7 de YM del nucleótido 9 al 25. Dada esta secuencia el transcrito iniciaría con los nucleótidos GGG ATG GAG TCT ACT CAG C. Tm 70.2°C.

- **YMX3 (secuencia 5'-3'):** GAC TAT TCA TAC GTA CAT TCA TAG. Corresponde a la secuencia complementaria a los nucleótidos 921 a 942 del gen 7 de YM. Tm 50.5°C.

Se produjo ADNc del segmento 7 del rotavirus YM a partir de ARNcd genómico usando una mezcla de transcripción reversa de 10  $\mu$ L totales a partir de 2.5  $\mu$ L ARNcd de rotavirus YM, 0.5  $\mu$ L H<sub>2</sub>O tratada con DEPC y 0.5  $\mu$ L de cada uno de los oligonucleótidos YMT75 y YMX3 [10  $\mu$ M]. La mezcla se desnaturizó a 94°C por 3 minutos y al descender la temperatura a 55°C se adicionó una mezcla de TR conteniendo: 2  $\mu$ L de amortiguador de síntesis de ADNc 5 X, 0.5  $\mu$ L DTT [0.1 M], 0.5  $\mu$ L RNase Out (Roche), 0.5  $\mu$ L H<sub>2</sub>O tratada con DEPC, 1.0  $\mu$ L de la mezcla de los cuatro desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) [10 mM] y 0.5  $\mu$ L de la transcriptasa reversa ThermoScript [15 U/ $\mu$ L]. La mezcla se incubó a 50°C durante 60 minutos y después a 85°C durante 5 minutos para inactivar la enzima. Para degradar la cadena molde se adicionaron 0.5  $\mu$ L de RNase H [2 U/ $\mu$ L] y se incubó por 20 minutos a 37°C. El ADNc obtenido se utilizó para amplificar el gen 7 de rotavirus YM por PCR.

#### **Amplificación del segmento 7 de rotavirus YM**

La amplificación del ADNc del segmento 7 de rotavirus YM se realizó por la reacción de polimerasa en cadena (PCR) en un volumen final de reacción de 20  $\mu$ L que contenía: 0.8  $\mu$ L del ADNc de rotavirus YM, 12.8  $\mu$ L H<sub>2</sub>O tratada con DEPC, 0.4  $\mu$ L dNTP's [10 mM], 0.8  $\mu$ L oligonucleótido YMT75 [10 $\mu$ M], 0.8  $\mu$ L oligonucleótido YMTX3 [10 $\mu$ M], 2.0  $\mu$ L amortiguador A 5x, 2  $\mu$ L de amortiguador B 5x [1.5 mM final de Mg<sup>2+</sup>] y 0.5  $\mu$ L enzima Elongasa [1 U/ $\mu$ L]. Se utilizó un programa en el termociclador de 30 segundos de desnaturización a 94°C, 30 segundos de alineación a 50°C y 60 segundos de extensión a 68°C durante 30 ciclos. Al final de la reacción 5 $\mu$ L del ADN amplificado se analizaron en un minigel de agarosa al 1% en buffer TAE 1 X a 100 V, durante 1 hora en

cámara Horizon 58 para determinar la presencia del gen amplificado. Se usaron 5  $\mu$ L de marcador de peso molecular de ADN lineal de 1 Kb para estimar el número de pares de bases del ADN producido.

#### **Purificación de ADN en minicolumna Wizard.**

El ADN producido por PCR se purificó por la afinidad que presenta con la resina de la minicolumna Wizard. Los reactivos utilizados fueron proporcionados por el fabricante (Promega). En un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL se colocaron 100  $\mu$ L del amortiguador de purificación directa, 60  $\mu$ L de ADN del segmento 7 amplificado y 1.0 mL de resina, se homogenizaron en vórtex moderado (para no romper el ADN) por 1 minuto. La mezcla se depositó en una minicolumna (colocada sobre un tubo de recolección de 2 mL) usando una jeringa para que la mezcla resina/ADN pasara lentamente a través de la minicolumna y la columna se lavó depositando 2 mL de isopropanol al 80 % (grado HPLC) haciéndolo pasar a través de ella y desechando el solvente. La minicolumna se secó por centrifugación a 13 000 r.p.m. durante 2 minutos en microcentrifuga Eppendorf y se eluyeron los fragmentos de ADN unidos a la resina agregando 30  $\mu$ L de agua (Milli Q y estéril), dejando reposar 2 minutos a temperatura ambiente y centrifugando la minicolumna por 20 segundos a 13 000 r.p.m. sobre un tubo de recolección. El ADN recuperado se analizó en un minigel de agarosa 1 % en amortiguador TAE 1x a 100 V durante 1 hora en cámara Horizon 58. A partir del marcador de ADN de 1 Kb se estimó el rendimiento de la reacción (anexo C).

## Digestión del gen 7 de rotavirus YM

Con el fin de generar fragmentos de NSP3 del rotavirus YM con deleciones en el extremo carboxilo se digirió el ADN amplificado a partir del gene 7 con 4 enzimas que poseen sitios de restricción sobre su secuencia. Los fragmentos de ADN esperados y las enzimas utilizadas son:

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

Proteína	Enzima	Fragmento ADN
NSP3 <sub>4-94</sub>	Bcl I	282 Pbs
NSP3 <sub>4-154</sub>	BstN I	462 Pbs
NSP3 <sub>4-196</sub>	Xba I	588 Pbs
NSP3 <sub>4-245</sub>	Bgl II	735 Pbs
NSP3 <sub>4-313</sub>	---	942 Pbs

Las condiciones óptimas de cada reacción varían de acuerdo a cantidad obtenida de cada segmento digerido, (en los fragmentos menores, la cantidad obtenida fue menor) estas condiciones se describen en la tabla 3. Todas las enzimas se inactivaron incubando las muestras 10 minutos a 80° C y posteriormente a 4°C durante 10 minutos. Los productos digeridos se analizaron en un minigel de agarosa en buffer TAE 1x y en cámara Horizon 58 incluyendo un control de 5µL de marcador de ADN lineal de 100 Pbs. Las condiciones de corrimiento electroforético optimas para el análisis de cada producto de digestión también se describen en la tabla 3.

**Tabla 3. Condiciones de digestión del ADN del gene 7 del rotavirus YM con 4 enzimas de restricción**

Enzima	Bcl I	BstN I	Xba I	Bgl II
Proteína a la que codifica	NSP3 <sub>1-94</sub>	NSP3 <sub>1-154</sub>	NSP3 <sub>1-196</sub>	NSP3 <sub>1-245</sub>
ADN digerido	3.0 µg	2.0 µg	2.0 µg	1.5 µg
Amortiguador de reacción (2 µL)	NEB3 10x	NEB2 10x	Gibco 2 10x	Gibco 3 10x
Unidades de enzima	3 U	4 U	4 U	1 U
Condiciones de incubación	2 horas a 50°C	2 horas a 60°C	2 horas a 37°C	2 horas a 37°C
Condiciones de corrida electroforetica	Minigel de agarosa 2 % a 80 V por 20 min.	Minigel de agarosa 2 % a 80 V por 30 min.	Minigel de agarosa 1 % a 100 V por 30 min.	Minigel de agarosa al 1 % a 100 V por 40 min.

**Purificación de los productos de digestión en gel de agarosa/ minicolumna QIA Quick (Qiagen) o por minicolumna Wizard (Promega)**

Los reactivos para estas purificaciones fueron proporcionados por el fabricante. Los productos de la digestión del ADN del gen 7 de rotavirus con las enzimas Bgl II, Xba I y BstN I se purificaron en minicolumna Wizard para eliminar sales e impurezas que afectarían su transcripción y traducción *in vitro* de acuerdo al procedimiento recomendado por el fabricante. Se analizaron 3 µL del ADN purificado en un minigel de agarosa al 2 % a 80 V durante 30 minutos

en cámara Horizon 58 y el rendimiento se cuantificó usando 5 $\mu$ L de marcador de 1 Kb (anexo C).

El ADN digerido con la enzima Bcl I se purificó por separación electroforética en gel de agarosa de bajo punto de fusión ya que esta enzima posee dos sitios de restricción en la secuencia del gene 7 de rotavirus YM lo que produciría dos fragmentos traducibles. El ADN digerido se corrió en un minigel de agarosa 0.6 % de bajo punto de fusión a 80 V durante 30 minutos en cámara Horizon 58. La banda observada bajo luz UV de onda corta se cortó y se pesó (máximo 400 mg) colocándose en un tubo Falcon de 5 mL. Se adicionaron 3 volúmenes de amortiguador QG por volumen de gel y se incubó a 50 °C por 10 minutos en baño María para disolver la agarosa. Una vez disuelta la agarosa se adicionó un volumen de isopropanol al 80 % (grado HPLC) por volumen del gel, la mezcla se depositó suavemente en una columna QIA Quick (colocada sobre un tubo de recolección de 2 mL) con ayuda de una jeringa y la columna se centrifugó por un minuto a 13 000 r.p.m. para eliminar la agarosa. La adsorción de ADN a la columna se completó adicionando 0.5 mL de buffer QG y centrifugando 1 minuto a 13 000 r.p.m. Para lavar la columna se colocaron 0.75 mL de amortiguador PE (con etanol) a la columna y se centrifugó 1 minuto a 13 000 r.p.m. El lavado se repitió y para retirar el exceso de etanol en la columna nuevamente se centrifugó 1 minuto a 13 000 r.p.m. Finalmente el ADN se eluyó adicionando 30  $\mu$ L de agua al centro de la columna, incubando dos minutos a temperatura ambiente y centrifugando 1 minuto a 13 000 r.p.m. Se corrió un gel de agarosa al 2% en amortiguador TAE 1 x a 80 V, durante 45 minutos en cámara Horizon 58 para determinar la presencia de los segmentos purificados así como un control de 5  $\mu$ L de marcador de peso molecular de 1 Kb.

### **Transcripción / traducción *in vitro* de la proteína NSP3**

Para la transcripción / traducción *in vitro* de la proteína NSP3 se utilizaron 3 sistemas que dependen de la ARN polimerasa T7 para transcripción y de lisados de reticulocitos de conejo para traducción. Uno de los sistemas emplea



transcripción y traducción separadas, mientras que los otros dos lo hacen en forma simultánea y solo difieren en que uno esta optimizado para productos de PCR.

*Transcripción/traducción simultánea con el sistema TNT T7 (Promega).* Los reactivos utilizados fueron proporcionados por el fabricante. La mezcla de reacción se hizo en un tubo de 200  $\mu\text{L}$  a 4  $^{\circ}\text{C}$  con un volumen final de 20  $\mu\text{L}$  conteniendo: 1.0  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas, 400 ng de ADN purificado del segmento 7, 1.0  $\mu\text{L}$  metionina  $^{35}\text{S}$  [15  $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$ ]. Como control se usó ADN que codifica a luciferasa por lo que en otro tubo se mezclaron para un volumen final de 10  $\mu\text{L}$ : 0.9  $\mu\text{L}$  agua libre de nucleasas, 0.1  $\mu\text{L}$  ADN de luciferasa, 1  $\mu\text{L}$  (15  $\mu\text{Ci}$ ) metionina  $^{35}\text{S}$  (Redivue). La mezcla Master TNT Quick compuesta por el lisado de reticulocitos y los factores necesarios para la transcripción/ traducción se retiró de -70 $^{\circ}\text{C}$ , se adicionaron 16  $\mu\text{L}$  al tubo experimental y 8  $\mu\text{L}$  al tubo control homogenizando con la pipeta. Las muestras se incubaron por 90 minutos a 30 $^{\circ}\text{C}$ .

*Transcripción y traducción separadas con ARN polimerasa T7 y lisado de reticulocitos.* Se mezclaron en un tubo de 200  $\mu\text{L}$  de pared delgada a temperatura ambiente para un volumen de reacción final de 20  $\mu\text{L}$ : 100 ng de ADN del segmento 7, 2.4  $\mu\text{L}$  de agua estéril Milli Q, 1.0  $\mu\text{L}$  de análogo de CAP [10 mM], 2.0  $\mu\text{L}$  de amortiguador de la polimerasa T7 5x (tris HCl 0.2 M, NaCl 125 mM, espermidina 10 mM,  $\text{MgCl}_2$ ), 1.0  $\mu\text{L}$  mezcla de los cuatro NTP's [10 mM], 0.5  $\mu\text{L}$  DTT [0.1 mM], 0.1  $\mu\text{L}$  RNase Out [10 U/ $\mu\text{L}$ ] y 1.0  $\mu\text{L}$  de polimerasa T7 [15 U/ $\mu\text{L}$ ]. Se incubó durante 1 hora. La traducción se realizó en un tubo de 200  $\mu\text{L}$  para un volumen final de 20  $\mu\text{L}$  conteniendo: 0.6  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  estéril, 0.4  $\mu\text{L}$  de una mezcla de aminoácidos sin metionina, 1.0  $\mu\text{L}$  metionina  $^{35}\text{S}$  [15  $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$ ], 4  $\mu\text{L}$  ARNm de segmento 7 de YM y 14  $\mu\text{L}$  de lisado de reticulocitos de conejo. Paralelamente se corrió un control conteniendo ARNm de luciferasa mezclando en un tubo para un volumen final de 10  $\mu\text{L}$ : 0.6  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  estéril, 0.4  $\mu\text{L}$  mezcla de aminoácidos sin metionina, 0.5  $\mu\text{L}$  metionina  $^{35}\text{S}$ , 0.5  $\mu\text{L}$  ARNm de luciferasa y 8  $\mu\text{L}$  lisado de reticulocitos de conejo. Las muestras se incubaron 2 horas a 30 $^{\circ}\text{C}$ .

*Transcripción y traducción simultanea con el sistema TNT T7 para productos de PCR (Promega).* El ensayo se realizó usando un sistema acoplado de transcripción /traducción *in vitro* optimizado para productos de PCR. El procedimiento utilizado es igual al descrito en transcripción / traducción simultanea con el sistema TNT T7.

De cada producto de reacción se tomaron 5 $\mu$ L y se les adicionaron 5  $\mu$ L de amortiguador de muestra 1x, se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 12 %, en amortiguador de corrida Laemli, a 200 V por 6 horas en cámara de electroforesis Hoeffer procesando el gel para su análisis por autorradiografía (anexo B).

#### **Producción de las proteínas NSP3 truncadas en el extremo carboxilo**

Las proteínas con deleciones en el extremo carboxilo se produjeron por transcripción/traducción acoplada usando el sistema de transcripción y traducción simultanea TNT T7 para productos de PCR. Las mezclas de reacción se hicieron en tubos de 200  $\mu$ L a 4 °C para un volumen final de 50  $\mu$ L conteniendo: 1.0  $\mu$ g de ADN del segmento 7 digerido por cada enzima, 2.5  $\mu$ L de metionina <sup>35</sup>S [15  $\mu$ Ci/  $\mu$ L] y 40  $\mu$ L de la mezcla Master Mix para PCR. Las muestras se incubaron por 90 minutos a 30 °C y se analizaron 3 $\mu$ L de cada reacción, los cuales se mezclaron con 3 $\mu$ L de amortiguador de muestra 2x y se corrieron en gel de poliacrilamida- SDS al 16 % en amortiguador Laemli 1x a 200 V por 6 horas en cámara de electroforesis Hoefer. El gel se procesó para su análisis autorradiográfico (anexo B).

#### **Transcripción reversa para generar segmentos del gen 7 con deleciones en el extremo amino**

El diseño de los oligonucleótidos para amplificar el gen 7 de rotavirus YM que codifique a proteínas NSP3 deletadas en el extremo amino se basó en la secuencia del gen (anexo A) proporcionada por la Dra. Susana López del

Instituto de Biotecnología, UNAM. Los oligonucleótidos YMT731, YMT781, YMT7150 y YMT7182 contienen el promotor T7 modificado (TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA TG) donde se cambiaron los últimos dos nucleótidos del promotor (GA) por TG para generar el codón de iniciación ATG y enseguida contienen secuencias derivadas del gene 7 de rotavirus YM. Para el diseño de estos se uso el programa DNAMAN. Los oligonucleótidos son:

- YMT731: GAA TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA TGG AAT TGA TGG GTA TT. Permite amplificar a partir del aminoácido 31. Contiene los nucleótidos 91 al 105 del gene 7 de YM.
- YMT781: GAA TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA TGG TTG TAA GAA ATA GAA A. Permite amplificar a partir del aminoácido 81. Contiene los nucleótidos 241-258 del gene 7 de YM.
- YMT7150: GAA TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA TGG GAG AGG TTG AAGT. Permite amplificar a partir del aminoácido 151. Contiene los nucleótidos 450 al 464 del gen 7 de YM.
- YMT7182: GAA TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA TGG AGT CAC TAA AGC AGA. Permite amplificar a partir del aminoácido 182. Contiene los nucleótidos 544 al 560 del gene 7 de YM.
- YMX3: GAC TAT TCA TAC GTA CAT TCA TAG. Es complementario a los nucleótidos 921 a 942 del gen 7 de YM.

Para la reacción de transcripción reversa se colocaron en un tubo de 200  $\mu$ L: 1.5  $\mu$ L H<sub>2</sub>O tratada con DEPC, 2.5  $\mu$ L ARNcd de YM, 0.5  $\mu$ L oligonucleótido 5' (YMT731, YMT781, YMT7150 ó YMT7182) [10 mM], 0.5  $\mu$ L oligonucleótido YMX3 [10 mM], el ARNcd en la mezcla se desnaturizó a 94 °C por 3 minutos. Al descender la temperatura a 55 °C se adicionaron 2.0  $\mu$ L amortiguador de síntesis ADNc 5x, 0.5  $\mu$ L DTT [0.1 M], 0.5  $\mu$ L RNase OUT , 0.5  $\mu$ L H<sub>2</sub>O tratada con DEPC , 1.0  $\mu$ L dNTP's [10 mM ] y 0.5  $\mu$ L de enzima ThermoScript , se incubo a 50 °C por 60 minutos. La reacción se detuvo incubando a 85 °C por 5 minutos. La cadena molde de ARN se degradó adicionando 0.5  $\mu$ L de

RNase H [2 U/ $\mu$ L] e incubando por 20 minutos a 37°C. El ADNc obtenido se uso como molde para amplificación por PCR.

### **Amplificación del gen 7 de rotavirus YM con deleciones en el extremo amino**

La amplificación del ADN que codifica para las proteínas NSP<sub>331-313</sub>, NSP<sub>381-313</sub>, NSP<sub>3150-313</sub> y NSP<sub>3181-313</sub> se realizó seleccionando primero las condiciones óptimas para cada segmento. En tubos de 200  $\mu$ L de pared delgada a 4°C se colocaron los volúmenes indicados en la tabla 5 para cada amplificación. Las concentraciones de Mg<sup>++</sup> finales fueron de 1.5 mM para NSP<sub>331-313</sub> y NSP<sub>3181-313</sub>, y para NSP<sub>381-313</sub> y NSP<sub>3150-313</sub> fue 2 mM. Después de la amplificación se analizaron 3  $\mu$ L del ADN obtenido de cada reacción en minigel de agarosa al 1 % en amortiguador TAE 1x en cámara Horizon 58 a los voltajes y tiempos indicados en la tabla 4.

El ADN amplificado se purificó en minicolumna Wizard con el procedimiento descrito anteriormente. Se analizaron 2 $\mu$ L del ADN purificado en un minigel de agarosa al 2 % corriendo a 80 V durante 30 minutos en cámara Horizon 58 y se cuantificó por comparación con 5  $\mu$ L de marcador de peso molecular de 1 Kb (anexo C).

Tabla 4. Condiciones de PCR para la amplificación de los segmentos del gen 7 de rotavirus YM que codifican para proteínas NSP3 con deleciones en el extremo amino.

PROTEÍNAS

Reactivos	NSP3 <sub>31-313</sub>	NSP3 <sub>81-313</sub>	NSP3 <sub>150-313</sub>	NSP3 <sub>181-313</sub>
H <sub>2</sub> O	12 µL	10.3 µL	12.8 µL	10.3 µL
ADNc	0.8 µL	0.8 µL	0.8 µL	0.8 µL
dNTPs 10 mM	0.4 µL	-----	0.4 µL	-----
dNTPs 2 mM	-----	0.5 µL	-----	0.5 µL
oligonucleotido 5' 10mM	0.8 µL	-----	0.8 µL	-----
oligonucleotido 5' 100nM	-----	2.0 µL	-----	2.0 µL
oligonucleótido 3' 10mM	0.8 µL	-----	0.8 µL	-----
oligonucleótido 3' 100nM	-----	2.0 µL	-----	2.0 µL
amortiguador A 5x	2.0 µL	-----	-----	2.0 µL
amortiguador B 5x	2.0 µL	4.0 µL	4.0 µL	2.0 µL
elongasa [1 U/µL]	0.4 µL	0.4 µL	0.4 µL	0.4 µL
volumen final	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL
<b>Condiciones de termociclador</b>				
Número de ciclos	30 ciclos	30 ciclos	30 ciclos	35 ciclos
Desnaturalización	94 °C / 30"	94°C / 30"	94 °C / 30"	94 °C / 30"
Alineación	50 °C / 30"	47°C / 30"	47 °C / 30"	50 °C / 30"
Elongación	68 °C / 60"	68°C / 60"	68 °C / 60"	68 °C / 60"
<b>Condiciones de corrimiento electroforetico</b>				
	100 V/ 45'	80 V/ 30''	80 V/ 30'	80 V/ 20'

### **Transcripción/traducción *in vitro* de las proteínas NSP3 truncadas en el extremo amino.**

Para la generar deleciones en el extremo amino de la proteína NSP3 los ensayos de transcripción/traducción simultánea se realizaron con un solo sistema, el TNT T7 para ADN producido por PCR. Las mezclas de reacción se hicieron en tubos de 200  $\mu$ L sobre hielo para un volumen final de 50  $\mu$ L. Se mezclaron: 7.5  $\mu$ L de ADN que codifica para la proteína NSP3 truncada, 2.5  $\mu$ L (30  $\mu$ Ci) de metionina  $^{35}$ S y 40  $\mu$ L de la mezcla Master Mix, se incubaron por 90 minutos a 30° C. Se tomaron 3 $\mu$ L de cada reacción y se mezclaron con 3 $\mu$ L de amortiguador de muestra 2x los cuales se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 16 % en amortiguador de corrida Laemli 1x a 200 V por 6 horas en cámara de electroforesis Hoeffer. Se usaron marcadores de peso molecular con  $^{14}$ C como control. El gel se procesó para su análisis autorradiográfico.

### **Radioinmunoprecipitación de las proteínas NSP3**

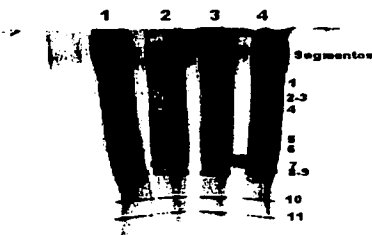
La radioinmunoprecipitación se realizó precubriendo proteína A-sefarosa con un anticuerpo monoclonal, retirando el exceso de anticuerpo y haciendo reaccionar la sefarosa-anticuerpo con las proteínas radioactivas en presencia de detergentes suaves. En tubos de 1.5 mL se colocaron 20  $\mu$ L de proteína A-sefarosa, 0.5 mL de PBS frío, 1  $\mu$ L de anticuerpos (PNS31, PNS32, PNS34, PNS35, PNS36, IE11 anti-VP6 o suero hiperinmune anti-NSP3) y 5  $\mu$ L de triton 1 %, las mezclas se agitaron suavemente y se incubaron por 3 horas a 4 °C. Posteriormente se microcentrifugaron 1 minuto a 14 000 r.p.m. a 4 °C, desechando los sobrenadantes con una pipeta Pasteur conectada al vacío. Los complejos anticuerpo-proteína A-sefarosa se lavaron dos veces con 1 mL de buffer no desnaturante, microcentrifugando 1 minuto a 14 000 r.p.m. a 4 °C y retirando el sobrenadante. A cada tubo se le adicionaron 10  $\mu$ L de albúmina

bovina 10% y 316  $\mu\text{L}$  de una solución conteniendo 4  $\mu\text{L}$  de la proteína NSP3 radioactiva, 300  $\mu\text{L}$  de buffer de lisis no desnaturalizante y 12  $\mu\text{L}$  de inhibidor de proteasas Complete 25x (No. catálogo 1697498), las mezclas se homogenizaron suavemente con la micropipeta y se incubaron por 3 horas y media a 4° C en agitación constante. Después de la incubación los tubos se centrifugaron 1 minuto a 14 000 r.p.m. y se desechó el sobrenadante, las perlas de sefarosa se lavaron 3 veces con 1 mL de amortiguador de lavado A frío y una vez con PBS 1x frío. Al final a cada uno de los tubos se le adicionaron 40  $\mu\text{L}$  de buffer de muestra 1x y se analizaron por electroforesis en gel de 1.5 cm de espesor de poliacrilamida-SDS al 12 % en buffer Laemli 1x a 200 V por 6 horas en cámara de electroforesis Hoeffer, usando como control marcadores de peso molecular con  $^{14}\text{C}$ . El gel se procesó para su análisis autorradiográfico (anexo B) y se determinó la presencia de complejos entre la proteína NSP3 y los anticuerpos monoclonales usando el analizador de imágenes FX.

Para las proteínas NSP3 truncadas, las radioinmunoprecipitaciones se realizaron usando un control positivo adicional donde el anticuerpo PNS31 se utilizó para precipitar a la proteína NSP3 completa y las determinaciones se realizaron usando 7  $\mu\text{L}$  de proteína recombinante. El análisis se hizo en gels de 1.5 cm de espesor de poliacrilamida-SDS al 16 %.

## RESULTADOS

Para obtener ARN genómico de rotavirus YM se infectaron células MA-104 con la cepa YM pase 2 y llamando a la cepa producida YM pase 3. Con el fin de demostrar la identidad del virus producido se hizo electroforesis en gel de poliacrilamida del ARN viral y se comparó con el ARNcd de la cepa padre y de otros dos pases de YM donde se encontró que el patrón electroforético del ARN obtenido (Figura R1) es idéntico al de las cepas usadas como control. El patrón electroforético del ARNcd genómico de rotavirus contiene 11 segmentos numerados de acuerdo a su movilidad electroforética, aunque en este caso dos pares de bandas (2-3 y 8-9) comigraron en las condiciones en las que se realizó el ensayo ( Figura R1).

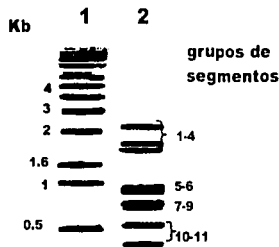


**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

Figura R1. Electroforesis en gel de poliacrilamida 12 % y tinción con sales de plata de ARNcd genómico del rotavirus YM. Carril 1, YM producido para este estudio (pase 3); carril 2, rotavirus YM cepa padre (pase 2); carril 3, YM pase 2B; carril 4, YM cepa pase 1.



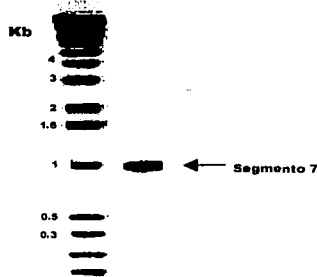
Una vez demostrada la identidad del virus YM (pase 3) usado para este estudio procedimos a extraer el ARNcd genómico con fenol-cloroformo-SDS, el cual también se purificó usando su propiedad de adsorberse a la resina RNeisy empacada en minicolumnas (Qiagen). La Figura R2 muestra el análisis por electroforesis en gel de agarosa del ARNcd del rotavirus YM purificado, donde se aprecian distintos grupos de segmentos del ARNcd de rotavirus ( 1-4, 5-6, 7-9 y 10-11), ya que la resolución de este tipo de geles es menor a la de geles de poliacrilamida. Empíricamente consideramos que la cantidad de ARNcd que permite visualizar esta técnica (5 ng mínimo por banda, Ausubel *et al.*,1996) es suficiente para realizar los ensayos de RT- PCR.



**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**Figura R2.** Electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio de ARNcd de rotavirus YM purificado. Carril 1, marcador de peso molecular de ADN de 1 Kb; carril 2, ARNcd del rotavirus YM.

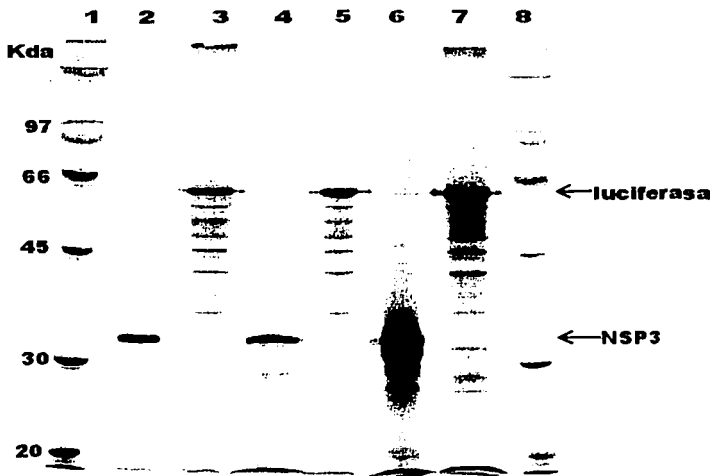
El ARN purificado se utilizó como molde para amplificar el gen 7 que codifica a la proteína NSP3 por transcripción reversa-reacción en cadena de polimerasa (Figura R3), se observándose que el peso molecular del gen amplificado, 1 Kb, corresponde con el esperado (942 Pbs).



**Figura R3.** Amplificación por RT-PCR del gen 7 del rotavirus YM. Carril 1, marcador de peso molecular de 1 Kb; carril 2, ADN amplificado del segmento genómico 7 del rotavirus YM

El ADN amplificado a partir del gen 7 del rotavirus YM se purificó por minicolumna Wizard (Promega) para eliminar compuestos que pudieran afectar su expresión y se usó para producir la proteína NSP3 empleando 3 sistemas de expresión por transcripción/traducción *in vitro*. Los tres sistemas de expresión usados dependen de la ARN polimerasa del bacteriófago T7 para transcribir el gene de interés y de lisado de reticulocitos para traducir el ARNm producido y solo nos interesaba conocer cual de ellos producía la proteína de interés con mayor eficiencia. Se encontró que el sistema acoplado de transcripción/traducción para ADN obtenido por PCR tuvo una mayor eficiencia en la producción de la proteína NSP3 de rotavirus YM (Figura R4, carril 6) o de la proteína control, luciferasa, para la cual el fabricante provee el ADN capaz de expresarla (Figura R4, carril 7) en comparación con los otros dos sistemas, el de transcripción/traducción acoplada no optimizado para PCR (Figura R4, carriles 2 y 3) o el de transcripción y traducción separadas (Figura R4, carriles 4 y 5), los cuales tuvieron una eficiencia menor tanto en la producción de la proteína NSP3 como en la producción de luciferasa.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

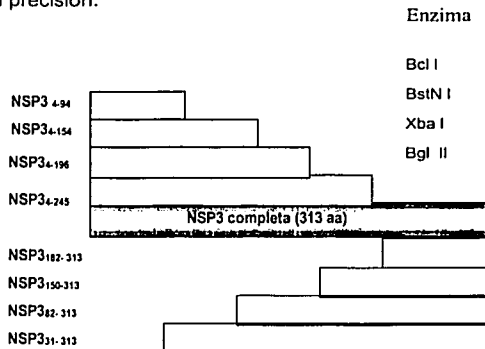


**Figura R4.** Ensayo de transcripción/traducción de NSP3 y del control de luciferasa a través de 3 sistemas de transcripción/traducción. Carriles 1 y 8, marcadores de peso molecular; NSP3 (carril 2) y luciferasa ( carril 3) expresadas en un sistema acoplado de transcripción / traducción; NSP3 (carril 4) y luciferasa (carril 5) expresadas por transcripción / traducción separada; NSP3 (carril 6) y luciferasa (carril 7) expresadas en un sistema acoplado de transcripción/traducción para ADN obtenido por PCR.

Una vez seleccionado el sistema de transcripción/traducción acoplado para ADN obtenido por PCR este se uso en todos los experimentos posteriores. A continuación se decidió producir 4 deleciones en el extremo carboxilo de la proteína NSP3 ubicados en forma aleatoria dependiendo de la existencia de sitios de restricción en el gen, de manera que se abarcara una región amplia. Las enzimas seleccionadas fueron Xba I, Bgl II, Bcl I y BstN I. Las proteínas esperadas como producto de la transcripción/traducción de los fragmentos de ADN digeridos con las enzimas seleccionadas se indican en la Figura R5.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

Por otro lado también se escogieron cuatro deleciones en el extremo amino seleccionadas al igual que las deleciones carboxilo para que abarcaran una región amplia del gene, solo que en este caso las mutaciones se produjeron directamente por amplificación con los oligonucleótidos apropiados sin recurrir al uso de enzimas de restricción y por lo tanto los sitios de las deleciones pudieron ser escogidos con precisión.



**Figura R5.** Proteínas NSP3 del rotavirus YM producidas con deleciones en los extremos amino y carboxilo.

Para obtener proteínas NSP3 con deleciones en el extremo carboxilo, el segmento 7 se digirió con las 4 enzimas de restricción seleccionadas, obteniéndose 4 segmentos de ADN (Figura R6) con pesos moleculares que corresponden a los esperados. Estos fragmentos de ADN fueron purificados por columna Wizard y electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



**Figura R6.** Digestión del segmento 7 de rotavirus. Carriles 1 y 7, marcadores de peso molecular; carriles 2-5 ADN digerido con Bcl (carril 2), BstN 1 (carril 3), Xba I (carril 4), Bgl II (carril 5).

Los segmentos digeridos se expresaron por transcripción /traducción *in vitro* obteniendo las proteínas NSP<sub>3<sub>4-94</sub></sub>, NSP<sub>3<sub>4-154</sub></sub>, NSP<sub>3<sub>4-196</sub></sub> y NSP<sub>3<sub>4-245</sub></sub> (Figura R7). Los pesos moleculares (PM) de las proteínas producidas difieren ligeramente de los esperados ya que en la proteína NSP<sub>3<sub>4-94</sub></sub> el PM obtenido (9 KDa) difiere del esperado (11 KDa) en 2 KDa, en NSP<sub>3<sub>4-154</sub></sub>, el PM obtenido (14 KDa) es 3 KDa mayor que el esperado (17 KDa), en NSP<sub>3<sub>4-196</sub></sub> el PM obtenido (20 KDa) es 2 KDa mayor que el esperado (22 KDa), finalmente en NSP<sub>3<sub>4-245</sub></sub> no hubo diferencia entre el PM obtenido (28 KDa) y el esperado. Así observamos que la máxima diferencia entre los pesos moleculares observados y los esperados fue de 3 KDa.

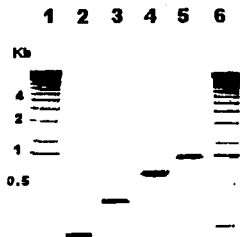
**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



**Figura R7.** Proteínas NSP3 del rotavirus YM con deleciones en el extremo carboxilo producidas por transcripción/traducción *in vitro*. Carril 1, marcador de peso molecular proteico; carril 2, NSP3<sub>4-94</sub>; carril 3, NSP3<sub>4-154</sub>; carril 4, NSP3<sub>4-190</sub>; carril 5, NSP3<sub>4-245</sub>; carril 6, NSP3<sub>4-313</sub> (proteína completa).

Una vez obtenidas las cuatro proteínas NSP3 truncadas en el extremo carboxilo nos enfocamos a obtener proteínas NSP3 truncadas en el extremo amino y para este fin se utilizó ARN genómico del rotavirus YM como molde para amplificar por RT-PCR para amplificar 4 distintos fragmentos de ADN diseñados siguiendo las parámetros antes explicados para la Figura R5. Los pesos moleculares obtenidos de los segmentos amplificados correspondieron a los esperados (Figura R8).

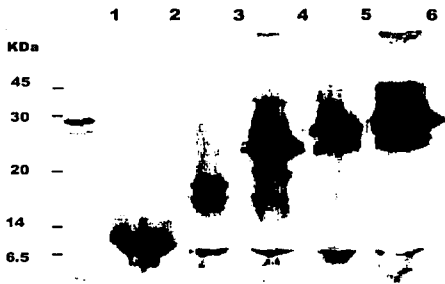
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Figura R8.** Amplificación del ADN que codifica para las proteínas NSP3 del rotavirus YM con deleciones en el extremo amino. Carriles 1 y 6, marcadores de peso molecular de 1 Kb; carril 2, ADN para producir NSP3<sub>182-313</sub>; carril 3, ADN para producir NSP3<sub>150-313</sub>; carril 4, ADN para producir NSP3<sub>81-313</sub>; carril 5, ADN para producir NSP3<sub>31-313</sub>.

Los segmentos de ADN amplificados (Figura R8) se purificaron y se expresaron por transcripción/traducción *in vitro* obteniendo las proteínas NSP3<sub>31-313</sub>, NSP3<sub>81-313</sub>, NSP3<sub>150-313</sub> y NSP3<sub>182-313</sub> como se ilustra en la Figura R9. Los pesos moleculares obtenidos difieren ligeramente de los esperados, en la proteína NSP3<sub>182-313</sub> el PM obtenido (10 KDa) del esperado (14 KDa) en 4 KDa, en NSP3<sub>150-313</sub> el PM obtenido (17 KDa) difiere del esperado (18 KDa) en 1 KDa, mientras que en NSP3<sub>81-313</sub> y NSP3<sub>31-313</sub> los PM obtenidos (25 y 30 KDa, respectivamente) no presentaron diferencia con los PM esperados. En la producción de las proteínas NSP3 truncadas se obtuvieron también productos secundarios en menor concentración (Figura R9).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Figura R9.** Producción de proteínas NSP3 con deleciones en el extremo amino. Carril 1 marcadores de peso molecular; carril 2, proteína NSP3<sub>182-313</sub>; carril 3, proteína NSP3<sub>150-313</sub>; carril 4, proteína NSP3<sub>81-313</sub>; carril 5, proteína NSP3<sub>31-313</sub>; carril 6, proteína NSP3<sub>4-313</sub> (completa).

Después de producir las proteínas NSP3 deletadas ya sea en el extremo carboxilo o amino se determinó la reactividad de los 5 anticuerpos monoclonales (ACM) anti-NSP3 disponibles (PNS31, PNS32, PNS34, PNS35 y PNS36) con la proteína NSP3 completa y sus diferentes fragmentos por radioinmunoprecipitación (RIPA). Inicialmente se comprobó que los distintos ACMs tuvieron la capacidad de inmunoprecipitar a la proteína NSP3 completa encontrándose que los cinco ACMs probados precipitan eficientemente a la proteína NSP3 de rotavirus YM así como el control positivo de suero hiperinmune anti-NSP3, pero no el anticuerpo monoclonal anti- VP6 de rotavirus usado como control negativo (Figura R10).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



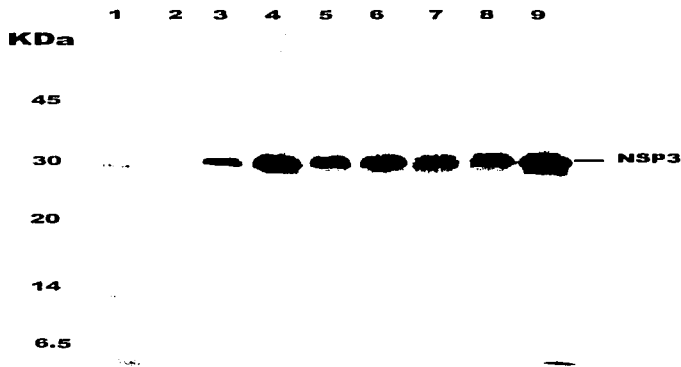
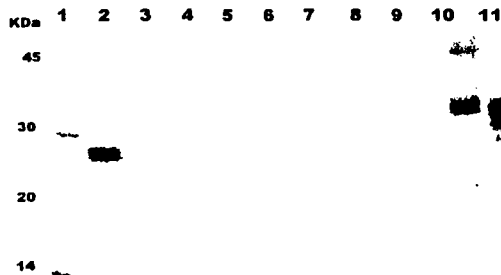


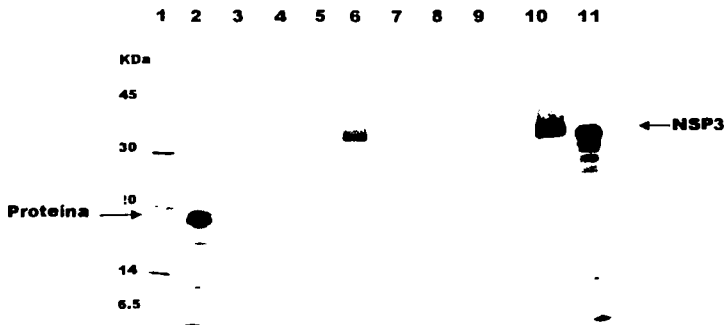
Figura R10. Radioinmunoprecipitación de la proteína NSP3 del rotavirus YM por 5 anticuerpos monoclonales anti-NSP3. Carril 1, marcador de peso molecular. Carriles 2-7, radioinmunoprecipitación con: anti VP6 (control negativo), carril 2; suero hiperinmune anti-NSP3 (control positivo), carril 3; PNS31, carril 4; PNS32, carril 5; PNS34, carril 6; PNS35, carril 7; PNS36, carril 8. El carril 9 muestra a la proteína NSP3 sin inmunoprecipitar.

Después de comprobar que los anticuerpos reaccionan fuertemente con la proteína NSP3 completa se realizaron las radioinmunoprecipitaciones de las proteínas NSP3 de rotavirus YM con deleciones en el extremo carboxilo (NSP3<sub>4-94</sub>, NSP3<sub>4-154</sub>, NSP3<sub>4-198</sub> y NSP3<sub>4-245</sub>) en donde se observó que ninguno de los anticuerpos monoclonales ni el suero hiperinmune anti-NSP3 fué capaz de inmunoprecipitar a las proteínas truncadas (Figuras R11-R14). Como el suero hiperinmune no funcionó apropiadamente como control positivo, se incluyó como segundo control positivo la radioinmunoprecipitación de la proteína NSP3 completa por el ACM PNS31 en cada uno de los experimentos mostrados en las Figuras R11-R14, observándose que en todos los experimentos el ACM PNS31 fue capaz de inmunoprecipitar a la proteína NSP3 completa.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

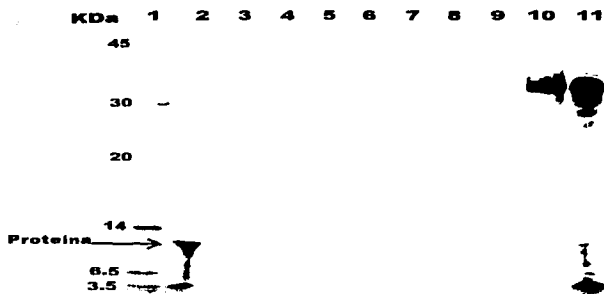


**Figura R11.** Radioinmunoprecipitación de la proteína NSP<sub>3,245</sub> del rotavirus YM con 5 anticuerpos monoclonales anti-NSP3. Carril 1, marcadores de peso molecular. Carril 2, proteína NSP<sub>3,245</sub> no inmunoprecipitada. Carriles 3-9 Radioinmunoprecipitaciones de NSP<sub>3,245</sub> con suero hiperinmune anti-VP6 (control negativo), carril 3; suero hiperinmune anti-NSP3 (control positivo), carril 4; PNS31, carril 5; PNS32, carril 6; PNS34, carril 7; PNS35, carril 8; PNS36, carril 9. Carril 10, RIPA de NSP3 completa con AMC PNS31 (control positivo). El carril 11 es NSP3 completa sin inmunoprecipitar.

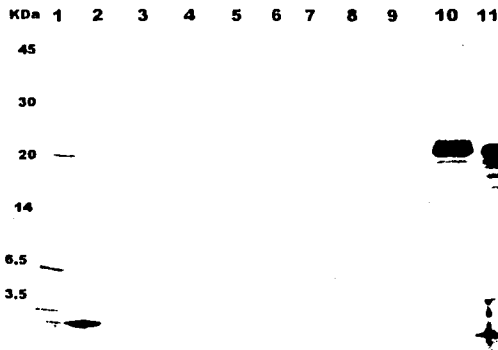


**Figura R12.** Radioinmunoprecipitación de la proteína NSP<sub>3,196</sub> de rotavirus YM con 5 anticuerpos monoclonales anti-NSP3. Carril 1, marcadores de peso molecular. Carril 2, proteína NSP<sub>3,196</sub> no inmunoprecipitada. Carriles 3-9 Radioinmunoprecipitaciones de NSP<sub>3,196</sub> con suero hiperinmune anti-VP6 (control negativo), carril 3; suero hiperinmune anti-NSP3 (control positivo), carril 4; PNS31, carril 5; PNS32, carril 6; PNS34, carril 7; PNS35, carril 8; PNS36, carril 9. Carril 10, RIPA de NSP3 completa con AMC PNS31 (control positivo). El carril 11 es NSP3 completa sin inmunoprecipitar.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

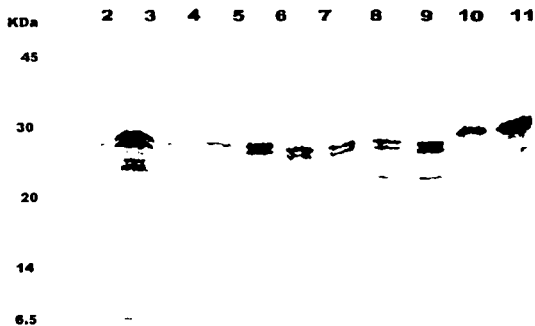


**Figura R13.** Radioimmunoprecipitación de la proteína NSP<sub>3<sub>4-154</sub></sub> del rotavirus YM con 5 anticuerpos monoclonales anti-NSP3. Carril 1, marcadores de peso molecular. Carril 2, proteína NSP<sub>3<sub>4-154</sub></sub> no inmunoprecipitada. Carriles 3-9 Radioimmunoprecipitaciones de NSP<sub>3<sub>4-154</sub></sub> con suero hiperinmune anti-VP6 (control negativo), carril 3; suero hiperinmune anti-NSP3 (control positivo), carril 4; PNS31, carril 5; PNS32, carril 6; PNS34, carril 7; PNS35, carril 8; PNS36, carril 9. Carril 10, RIPA de NSP3 completa con AMC PNS31 (control positivo). El carril 11 es NSP3 completa sin inmunoprecipitar.

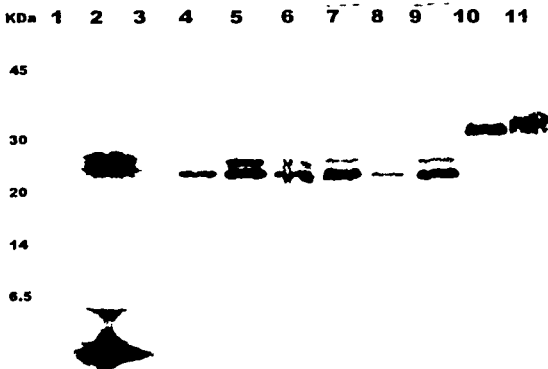


**Figura R14.** Radioimmunoprecipitación de la proteína NSP<sub>3<sub>4-94</sub></sub> del rotavirus YM con 5 anticuerpos monoclonales anti-NSP3. Carril 1, marcadores de peso molecular. Carril 2, proteína NSP<sub>3<sub>4-94</sub></sub> no inmunoprecipitada. Carriles 3-9 Radioimmunoprecipitaciones de NSP<sub>3<sub>4-94</sub></sub> con suero hiperinmune anti-VP6 (control negativo), carril 3; suero hiperinmune anti-NSP3 (control positivo), carril 4; PNS31, carril 5; PNS32, carril 6; PNS34, carril 7; PNS35, carril 8; PNS36, carril 9. Carril 10, RIPA de NSP3 completa con AMC PNS31 (control positivo). El carril 11 es NSP3 completa sin inmunoprecipitar.

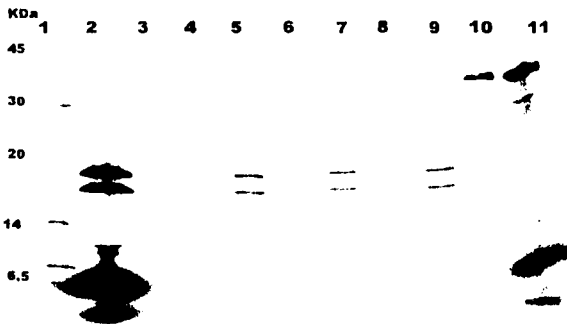
Después de realizar las radioinmunoprecipitaciones de las distintas deleciones carboxilo de la proteina NSP3 de YM por los cinco ACMS se realizaron ensayos de radioinmunoprecipitación usando las proteínas NSP3 con deleciones en el extremo amino. Todos los anticuerpos monoclonales y el suero hiperinmune anti-NSP3 fueron capaces de inmunoprecipitar las proteínas NSP3 de YM truncadas en el extremo amino como lo indican las Figuras R15-R18, presentando diferentes grados de reactividad ya que el anticuerpo monoclonal PNS35 presentó menor reactividad con las proteínas NSP3<sub>81-313</sub> y NSP3<sub>31-313</sub> en comparación con los otros ACMS usados (PNS31, PNS32, PNS34 y PNS36). El suero hiperinmune anti-NSP3 también fue capaz de inmunoprecipitar a las proteínas truncadas en el extremo amino y en ACM PNS31 inmunoprecipito a la proteína NSP3 completa usado como control positivo en la reacción.



**Figura R15.** Radioinmunoprecipitación de la proteína NSP3<sub>31-313</sub> del rotavirus YM con 5 anticuerpos monoclonales anti-NSP3. Carril 1, marcadores de peso molecular. Carril 2, proteína NSP3<sub>31-313</sub> no inmunoprecipitada. Carriles 3-9 Radioinmunoprecipitaciones de NSP3<sub>31-313</sub> con suero hiperinmune anti-VP6 (control negativo), carril 3; suero hiperinmune anti-NSP3 (control positivo), carril 4; PNS31, carril 5; PNS32, carril 6; PNS34, carril 7; PNS35, carril 8; PNS36, carril 9. Carril 10, RIPA de NSP3 completa con AMC PNS31 (control positivo). El carril 11 es NSP3 completa sin inmunoprecipitar

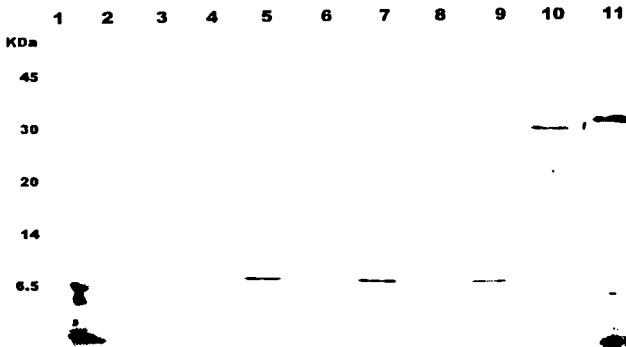


**Figura R16.** Radioinmunoprecipitación de la proteína NSP<sub>3</sub><sup>81-313</sup> del rotavirus YM por 5 anticuerpos monoclonales anti-NSP3. Carril 1, marcadores de peso molecular. Carril 2, proteína NSP<sub>3</sub><sup>81-313</sup> no inmunoprecipitada. Carriles 3-9 Radioinmunoprecipitación de NSP<sub>3</sub><sup>81-313</sup>; con suero hiperinmune anti-VP6 (control negativo), carril 3; suero hiperinmune anti-NSP3 (control positivo), carril 4; PNS31, carril 5; PNS32, carril 6; PNS34, carril 7; PNS35, carril 8; PNS36, carril 9. Carril 10, RIPA de NSP3 completa con AMC PNS31 (control positivo). El carril 11 es NSP3 completa sin inmunoprecipitar.



**Figura R17.** Radioinmunoprecipitación de NSP<sub>3</sub><sup>150-313</sup> del rotavirus YM con 5 anticuerpos monoclonales anti-NSP3. Carril 1, marcadores de peso molecular. Carril 2, proteína NSP<sub>3</sub><sup>150-313</sup> no inmunoprecipitada; Carriles 3-9 RIPA de NSP<sub>3</sub><sup>150-313</sup>; con suero hiperinmune anti-VP6 (control negativo), carril 3; suero hiperinmune anti-NSP3 (control positivo), carril 4; PNS31, carril 5; PNS32, carril 6; PNS34, carril 7; PNS35, carril 8; PNS36, carril 9. Carril 10, RIPA de NSP3 completa con AMC PNS31 (control positivo). El carril 11 es NSP3 completa sin inmunoprecipitar

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Figura R18.** Radioinmunoprecipitación de la proteína NSP<sub>3182-313</sub> del rotavirus YM con 5 anticuerpos monoclonales anti-NSP3. Carril 1, marcadores de peso molecular. Carril 2, proteína NSP<sub>3182-313</sub> no inmunoprecipitada. Carriles 3-9 RIPAS de NSP<sub>3182-313</sub>; con suero hiperinmune anti-VF6 (control negativo), carril 3; suero hiperinmune anti-NSP3 (control positivo), carril 4; PNS31, carril 5; PNS32, carril 6; PNS34, carril 7; PNS35, carril 8; PNS36, carril 9. Carril 10, RIPA de NSP3 completa con AMC PNS31 (control positivo). El carril 11 es NSP3 completa sin inmunoprecipitar

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## ANÁLISIS DE RESULTADOS

El objetivo del proyecto fue identificar los fragmentos mínimos de la proteína NSP3 del rotavirus YM necesarios para reaccionar con cinco anticuerpos monoclonales anti-NSP3, para lo cual se produjeron fragmentos proteicos truncados en el extremo amino ó en el extremo carboxilo por transcripción/traducción *in vitro*. Se logro amplificar el marco abierto de lectura completo del gene 7 que codifica a NSP3 así como fragmentos de este, generados a través de cortes con enzimas de restricción o por amplificación directa por RT-PCR. Este último método requiere oligonucleótidos específicos para cada fragmento, que son indispensables para que los fragmentos del gene de NSP3 de YM coincidan con el promotor de la polimerasa T7 y el codón de inicio de traducción. Algunas de las proteínas obtenidas presentaron pesos moleculares ligeramente diferentes a los esperados, posiblemente porque intrínsecamente su movilidad sea diferente de la esperada para una proteína promedio o porque las proteínas abundantes del lisado de reticulocitos (específicamente subunidades de hemoglobina con PM de 16 KDa), desplazan a las proteínas truncadas alterando el peso molecular aparente.

En la expresión de proteínas truncadas en el extremo amino se obtuvieron algunos fragmentos proteicos en baja concentración, los cuales probablemente son productos de degradación de la proteína mayoritariamente obtenida o menos probablemente se originaron por terminación prematura o iniciación anómala río abajo del codón de inicio seleccionado. La presencia de estas proteínas, aparentemente subfragmentos de la proteína mayoritaria no es importante para los fines del estudio ya que no impiden la observación de la inmunoprecipitación de la proteína principal por RIPA.

Las regiones mínimas de la proteína NSP3 que reconocen los anticuerpos se determinaron por RIPA donde ninguna de las proteínas truncadas en el extremo carboxilo fue reconocida por los anticuerpos anti-NSP3, mientras que los mismos

anticuerpos inmunoprecipitaron a todas las proteínas probadas con deleciones en el extremo amino. Estos resultados preliminares indican que los anticuerpos reconocen fragmentos proteicos grandes, lo que sugiere que los epitopos son de naturaleza conformacional. La baja eficiencia del anticuerpo PNS35 para inmunoprecipitar las proteínas NSP3<sub>150-313</sub>, y NSP3<sub>182-313</sub> indica que los aminoácidos 83-149 contribuyen de alguna manera a la conformación apropiada del epitopo reconocido por PNS35.

Los anticuerpos no reconocieron a las proteína truncadas en el extremo carboxilo lo que indica que al menos los últimos 68 aminoácidos truncados (deleción mínima) son importantes para la interacción anticuerpo-proteína NSP3. Los anticuerpos policlonales presentes en el suero hiperimmune anti-NSP3 tampoco fueron capaces de inmunoprecipitar a las proteínas NSP3 truncadas en el extremo carboxilo lo que sugiere que la deleción de estos aminoácidos en la proteína NSP3 es en general importante para el reconocimiento por anticuerpos a la proteína NSP3.

La necesidad de los últimos 68 aminoácidos del extremo carboxilo de NSP3 para que la proteína reaccione con los anticuerpos podría ser explicada si la deleción de estos 70 aminoácidos provoca modificaciones en la conformación tridimensional de la proteína críticas para su reconocimiento por anticuerpos. Otra posibilidad es que los anticuerpos reconozcan epitopos pequeños localizados directamente en el extremo carboxilo. Se requiere investigación adicional para acotar el dominio mínimo reactivo con los anticuerpos monoclonales con mayor precisión para decidir cual de las dos alternativas expuesta es la correcta.

La proteína NSP3<sub>182-313</sub> fue el fragmento mínimo reconocido por los 5 anticuerpos aun cuando a esta proteína se le deletaron las regiones neutra (aa 1-30), básica (aa 83-149) y ácida (aa 150-169), conservando el dominio completo de unión a eIF4G (aa 207-313) el cual se caracteriza por contener varias regiones de heptarepeticiones (HR). Estas regiones HR ubicadas entre los aminoácidos 181-236 y 275-305 son generalmente importantes para las interacciones proteína-proteína. Funcionalmente las deleciones realizadas a la proteína NSP3 de rotavirus YM que aun conservaron su interacción con anticuerpos (aa 182-313) incluyeron el dominio



de unión ARN (aa 4- 149) y el dominio de dimerización (aa 150-206) parcialmente, mientras que todas las deleciones (incluyendo la mínima de 68 aminoácidos) del dominio de unión al factor de inicio de traducción eIF4G (206–313aa) ubicado en el extremo carboxilo impidió la unión anticuerpo-antígeno. Desconocemos hasta el momento si los polipéptidos de NSP3 reactivos con los anticuerpos monoclonales y en especial si el fragmento mínimo (aa 182-313), son dimericos o no ya que se requieren experimentos ulteriores deletando al menos hasta el aminoácido 206, el polipéptido producido carecerá por completo del dominio de dimerización, para determinar la importancia de la dimerización en la reactividad de NSP3 con anticuerpos monoclonales.

El reconocimiento por los 5 anticuerpos monoclonales anti-NSP3 del dominio de unión a eIF4G, los convierte en herramientas útiles para estudiar la función inhibitoria de la proteína NSP3 sobre la traducción de proteínas celulares, la cual es la función conocida del dominio de NSP3 que se une a eIF4G.

## CONCLUSIONES

- ❖ Al menos los últimos 68 aminoácidos del extremo carboxilo son críticos para el reconocimiento por los cinco anticuerpos monoclonales anti-NSP3 a la proteína NSP3 de rotavirus YM.
- ❖ El fragmento mínimo de NSP3 reactivo a los cinco anticuerpos monoclonales identificado en este estudio, está compuesto por los aminoácidos 182-313, y carece del dominio de unión a ARN (aa 1-149) y contiene el dominio de unión a eIF4G (aa 206-313) por lo que se determinó que el extremo amino de NSP3 no es importante para el reconocimiento por los anticuerpos monoclonales anti-NSP3.
- ❖ Los epítomos reconocidos por los 5 anticuerpos monoclonales anti-NSP3 podrían ser de naturaleza conformacional ya que requieren un polipéptido mínimo de 131 aminoácidos.

## PERSPECTIVAS

- Producir e inmunoprecipitar una proteína truncada en los últimos 30 aminoácidos por digestión del ADN con la enzima Mfe. Esto permitirá reducir el número de aminoácidos necesarios para el reconocimiento de NSP3 y observar indirectamente el efecto de las deleciones de las cisteínas ubicadas en los aminoácidos 306 y 310.
- Producir e inmunoprecipitar la proteína NSP3<sub>207-313</sub> compuesta de los aa 207-313 lo que permitirá determinar el efecto de la deleción del dominio de dimerización en el reconocimiento de los anticuerpos anti-NSP3 a la proteína NSP3.
- Realizar una mutación puntual en el aminoácido 306 donde se encuentra una cisteína por RT-PCR usando oligonucleótidos específicos y determinar el papel de esta cisteína en el reconocimiento de los anticuerpos anti-NSP3.
- Utilizar los cinco anticuerpos monoclonales anti-NSP3 para estudiar la función inhibitoria de la proteína NSP3 ya que reconocen el dominio de NSP3 responsable de la unión a eIFG4.

## ANEXOS

### ANEXO A. Secuencia de gen 7 de rotavirus YM

La secuencia fue proporcionada por la Dra. Susana López, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México

```
1 CCTTTTAATG CTTTTCAGTG GTTGATGCTC AAGATGGAGT CTA CTACAGCA
51 GATGGTAGGT TCAATTATCA ACACCTCTTT TGAAGCTGCA GTTGTGCTG
101 CCACCTCAAC ATTAGAATTG ATGGGTATTC AATATGATTA CAATGAGGTA
151 TATACTAGAG TCAAAGTAA GTTTGATTAT GTGATGGATG ACTCTGGTGT
201 TAAAAACAAC CTTT TAGGTA AAGCTATGAC TATTGATCAA GCGTTAAATG
251 GAAAATTTGG CTCAGTTGTA AGAAATAGAA ATTGGATGAC TGATTCTAAA
301 ATAGTGGCTA AATTAGATGA GGATGTAAC AACTTAGAA TGATGTTATC
351 TTCTAAAGGA ATTGATCAA AGATGAGAGT ACTTAATGCT TGCTTTAGTG
401 TGAAAAGAAT ACCAGGAAA TCATCATCAA TCATTAAGTG TACCAGGCTT
451 ATGAGAGACA AAATAGAACG AGGAGAGGTT GAAGTTGACG ACTCATTGTG
501 TGATGAGAAG ATGGAAATTG ACACTATTGA TTGGAAATCT AGATATGACC
551 AATTAGAGAA GAGATTTGAG TCACTAAAGC AGAGAGTTAG TGAAAAGTAT
601 AATAATTTGGG TGCAGAAAGC GAAGAAAGTG AATGAAAATA TGTA CTCCCT
651 TCAAAATGTT ATTTACACGC AACAAAACCA GATAGCAGAT CTTC AACAGT
```

701 ATTGTAACAA ATTGGAAACT GACTTACAGA GCAAAATTAG TTCACTAGTG  
751 TCATCAGTAG AATGGTATTT AGATCTATG GAACTGTCAG ACGATGTTAA  
801 AACTGATATT GAACAACAAC TAAATTCAAT TGATGCAATC AATCCTATCA  
851 ATGCTATAGA CGATCTTGAA TCATTGATTA GAAATTTGAT CCAAGATTAC  
901 GACAGAACAT TTTTAATGTT GAAAGGACTT GTGAGGCAAT GCAACTATGA  
951 ATGTACGTAT GAATAGTCAC ATAATATAAA CTATATTAAC CATCTACACA  
1001 TGACCCTCTA TGAGCACAAT AGTAAAAGC TAACACTGTC AAAAACCTAA  
1051 ATGGCTATAG GGGCGTTATG TGACC

## **ANEXO B. Procesamiento de los geles para autoradiografía**

Para la fijación de las bandas, el gel se colocó en una solución metanol-ácido acético (40:10) por 30 minutos con agitación constante. Posteriormente para eliminar residuos de esta solución el gel se colocó en agua durante 30 minutos con agitación constante, retirando el gel del agua y colocándolo entre papel filtro (20 cm x 20 cm) y una película autoadherente (Kleen Pack). El gel se secó a 80 °C durante 2 horas. Se retiró la película adherente y el gel se expuso durante 12-16 horas en un cassette con pantalla sensible a radioactividad. Usando el analizador de imágenes F-X (BioRad) se obtuvo la imagen radioactiva del gel.

### **ANEXO C. Cuantificación de ADN en gel de agarosa**

La estimación del rendimiento se hizo a partir de un marcador de peso molecular de ADN lineal de 1 Kb. La muestra se corrió en un minigel de agarosa y para estimar el rendimiento se colocaron 5  $\mu$ L del marcador de peso molecular de ADN lineal de 1 Kb (stock: 100 ng/ $\mu$ l, Roche). Después de la corrida electroforética se comparó la intensidad de banda de 1.6 Kb de este marcador, la cual representa el 10 % (50 ng) de la cantidad total aplicada con la intensidad de la banda correspondiente al producto y se estimó visualmente o por densitometría la cantidad de ADN de la reacción.

### **ANEXO D. Composición de reactivos**

La preparación de los reactivos está reportada en *Current Protocols on Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, 1996).

#### Amortiguador 2 10x (Roche)

Tris-HCl 500 mM, MgCl<sub>2</sub> 100mM y NaCl 50 mM.

#### Amortiguador 3 10x (Roche)

Tris-HCl (pH 8) 500 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM y NaCl 100 mM.

#### Amortiguador de lisis no desnatralizante

1 mL triton X-100, Tris-HCl (pH 7.4) 50mM, NaCl 300 mM, EDTA 5 mM y 0.02% azida de sodio.

#### Amortiguador disruptor 5x

Tris-HCl (pH 6.8) 0.05 M, EDTA 0.05 M, NaCl 0.05 M y 5% SDS.

Amortiguador Laemli 10 x

3.03 gr de tris base, 14.4 g de glicina, 1 gr de SDS y 100 mL de agua. El pH final es 8.3

Amortiguador de lavado A

1 % Nodidet P40, 1% deoxicolato, 1 % triton y Tris - HCl (pH 6.8) 0.05M

Amortiguador de muestra 1x

0.625 mL de tris HCl 0.5 M pH 6.8, 1. 0 mL de SDS 10 %, 0.5 mL de glicerol, 0.25 mL de 2- mercaptoetanol, 0.23 mL de azul de bromofenol 1 %, 2.3 mL de agua destilada.

Amortiguador de purificación directa

Tris-HCl (pH 8.8) 50 mM, Mg Cl<sub>2</sub> 1.5 mM y 0.1 % triton X-100

Amortiguador NEB 2 10x

Tris-HCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 100 mM, NaCl 500 mM, ditiotritol 10 mM, pH 7.9

Amortiguador NEB3 10x

Tris-HCl 500 mM, MgCl<sub>2</sub> 100 mM, NaCl 100 mM, DTT 1 mM, pH 7.9

Amortiguador de síntesis DNA 5 x

Tris-HCl (pH 8.4) 250 mM, acetato de potasio 375 mM, acetato de magnesio 40 mM.

Amortiguador TAE 50x

224 g Tris base, 57.1 mL ácido acético glacial, 37.2 g Na<sub>2</sub>EDTA ?2 H<sub>2</sub>O y 900 mL agua destilada

Amortiguador TE

10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM MgCl<sub>2</sub>

Azul de bromofenol 1%

0.01 mg/ml azul de bromofenol en glicerol 50 %

Coctel de inhibidores Complete 25 x (Roche, No. Catálogo 1697498)

1 tableta, 2 mL de agua destilada o buffer de fosfatos 100 mM pH 7

Formaldehído 0.8 % y hidroxido de sodio 3 %

15 mL NaOH 10 M, 185 ml de agua, 1.6 ml de formaldehído concentrado.

Gel concentrador de poliacrilamida

Contiene un volumen total de 10 mL suficientes, para un gel de 16 x 4 cm de ancho: 4.6 mL de agua destilada. 3.5 mL de acrilamida. bisacrilamida (30%-0.8%), 1.8 mL tris 0.5 M (pH 6.8), 50 µL de persulfato de amonio 10 % y 5 µL de TEMED. Se desgasifica antes de colocarlo en la cámara.

Gel separador de poliacrilamida

Contiene un volumen total de 20 mL, suficientes para un gel de 16 x 12 cm de ancho: 9.7 mL de agua destilada, 6.5 mL de acrilamida-bisacrilamida (30%-0.8%), 3.25 mL tris 1.5 M (pH 8.8), 0.15 mL SDS 10 %, 150 µL de persulfato de amonio 10 % y TEMED 10 µL. Se desgasifica antes de colocarlo en la cámara.

4\*

Marcador de peso molecular de ADN lineal de 1 Kb (Roche)

100 µL solución stock del marcador, 100 µL agua destilada, 100 µL azul de bromofenol 1% ( en glicerol al 50 %).



Medio mínimo esencial (MEM) con SFB 10 %

400 mL de medio mínimo esencial, 12 mL de bicarbonato de sodio 7.5 %, 4 mL de solución stock penicilina/estreptomicina 100x, 4 mL de glutamina 100x y 42 mL de suero fetal bovino (Gibco BRL, No. Catálogo 16000-044).

PBS 1x

10 mL PBS A 10x, 10 mL PBS B 10x, 10 mL PBS 10x, 70 mL agua destilada.

Proteína A- Sefarosa

1.5 g de proteína A- Sefarosa en 30 mL de Tris 50 mM, pH 7.5

Verseno

0.2 gr EDTA? 4 Na, 100 mL PBS A 10x, 900 mL agua destilada

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Arias CF, Guerrero CA, Méndez E et al.**, (2001) Early events of rotavirus infection: the search for the receptor(s). in Gastroenteritis viruses. John Wiley, Chichester (Novartis Found Symp 238) pag 47-63.
2. **Ausubel FM, Brent R, Kingston ER, Morre DD, Seidman JG, Smith JA, Struht K (eds.)** (1994) Current protocols in molecular biology. John Wiley and Sons Inc. USA, Vol 1-4.
3. **Bern C, Glass R** (1994) Impact of diarrheal diseases worldwide. In: Viral infections of the gastrointestinal tract, 2 edn. Dekker, New York: 1-26
4. **Bern C, Martines J, Glass R** (1992) The magnitude of the global problem of diarrhoeal disease: ten year update. Bull WHO **70**: 704-705
5. **Bishop RF, Davinson GP, Holmes IH, Ruck BJ** (1973) Virus particule in ephitelian cell of duodenal mucosa from children with non-acute gastroenteritis. Lancet : 1281-1283
6. **Both GW, Bellamy AR, Siegman LJ** (1984) Nucleotide sequence of the dsRNA genomic segments 7 of simian rotavirus. Nucleic Acids Res **12**:1621-1626
7. **Brandt CD, Kim HW, Rodriguez WJ et al.**, (1983) Pediatric viral gastroenteritis during eighth years of study. J Clin Microbiol **18**:71-78
8. **Chen D, Zeng C, Wentz M, Gorziglia M, Estes M and Raming R** (1994) Template-dependent, in vitro replication of rotavirus RNA. J Gen Virol **68**: 7030 – 7039.
9. **Christensen, MS** (1989) Human viral gastroenteritis. Clin Microb Rev **2**: 51–89.
10. **Clark SM, Spendlove RS, Barnett BB** (1980) Role of two particle types in bovine rotavirus morphogenesis. J Virol **34**: 272-276

11. **Cook SM, Glass RI, LeBaron CW, Ho MS** (1990) Global seasonality of rotavirus infections. *Bull World Health Organ* **68**: 171-177
12. **Coulson BS, Longdrigan SL, Lee DJ** (1997) Rotavirus contains integrin ligand sequences and a disintegrin-like domain the are implicated in virus entry into cell. *Proc Natl Acad Sci* **94**: 5384-5394
13. **Deo CR, Groft CM, Rajashankar KR, Burley SK** (2002) Recognition of the Rotavirus mRNA 3' Consensus by an Asymmetric NSP3 Homodimer. *Cell* **108**: 71-81
14. **Doyle K, Miles J** (1996) *Protocols and Applications Guide*, third edition. Promega Corporation USA, pag 260-265
15. **Dubois-Dalq M, Homes KV and Rentier B** (1984) *Assembly of enveloped RNA viruses*. Springer-Verlag, USA, pag 234-238
16. **Estes MK** (2001) Rotaviruses and their replication. In *Fields virology*, 4 edn, USA, pag 1747-1765
17. **Ericson BL, Graham DY, Mason BB, Estes MK** (1982) Identification, synthesis and modification of simian rotavirus SA11 polypeptides in infected cell. *J Virol* **42**: 825-839
18. **Fields D, Knipe D, Howley, et al.,** (2001) *Fields Virology*, Fourth Edition, USA, pag 1747-1786
19. **Gallegos CO, Patton JT** (1989) Characterization of rotavirus replication intermediates: A model for the assembly of single-shelled particles. *Virology* **172**:616-627
20. **Graham DY, Estes MK** (1985) Proposed working serologic classification system for rotaviruses. *Ann Inst Pasteur* **136**: 5-12
21. **Graham DY, Sackman JW, Estes MK** (1984) Pathogenesis of rotavirus-induced diarrhoea. Preliminary studies in miniature swine piglet. *Dig Dis Sci* **29**: 1028-1035

22. **Greenberg HB, McAuliffe V, Valdesuso J et al.,** (1983) Serological analysis of the subgroup protein of rotavirus, using monoclonal antibodies. *Infect Immun* **39**:91-99
23. **Greenberg H, Shaw D** (1999) Rotaviruses in: *Encyclopedia of virology*, second edition, Academic Press, USA, pag 1576-1592
24. **Harlow E, Lane D.** (1998) *Using Antibodies: Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press , Canada, pag 2-50, 130-160.
25. **Imai, M, Akatani, K, Ikegami N And Furuichi Y** (1983) Capped and conserved terminal structures in human rotavirus double stranded RNA segments. *J. of Virology* **47**:125 –136
26. **Jiang B, Dennehy PH, Spangerberger S, Gentsch JR, Glass Ri** (1995) First detection of group C rotavirus in fecal specimens of children with diarrhea in the United States. *J Infect Dis* **172**:45-50
27. **Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS** (1972) Visualization by immune electron microscopy of a 27 nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol* **10**: 1075-1081.
28. **Kapikian AZ** (1993) Viral gastroenteritis. *JAM* **264** : 627-629
29. **Kapikian AZ, and Chanock RM** (1990) *Rotaviruses*, Raven Press, USA, pag 345-356
30. **Kapikian AZ, Yasuhaya H, Chanock RM** (2001) *Rotavirus in: Fields Virology*, 4 edition, Lippincott William & Wilkins, USA, pag 1748-1760.
31. **Kohler G, Milstein C** (1975) Continuous culture of fused cells secreting antibodies of predefined specificity. *Nature* **256**: 495-7
32. **Koopmans M, Brow D** (1999) The seasonality and diversity of group A in: *Europe Acta Paediatr Suppl* **88**:14-19
33. **Lawton JA, Estes MK, Prasad BV** (1997) Three-dimensional visualization of mRNA release from actively transcribing rotavirus particles. *Nat Struct Biol* **4**: 118-121
34. **Lawton JA, Estes MK, Prasad BV** (2000) Mechanism of genome transcription in segmented dsRNA viruses. *Adv Virus Res* **55**:185-229

35. **Linn S, Arber** (1968) Proc Natl Acad Sci USA **59**:1300-1310
36. **Liu M, Mattion NM, Estes MK** (1992) Rotavirus VP3 expressed in insect cells possesses guanylyltransferase activity. Virology **188**: 77-84
37. **McCrae MA, McCorquodale JG** (1983) Molecular biology of rotaviruses: terminal structure of viral RNA species. Virology **126**: 204 – 212
38. **Mackow E, Yamanaka M, Dang MN and Greenberg HB** (1990) DNA amplification-restricted transcription-translocation: Rapid analysis of rhesus rotavirus neutralization sites. Biochemistry **87**:518-522
39. **Meyer J, Bergman C, Bellamy R** (1989) Interaction of rotavirus cores with the nonstructural glycoprotein NS28. Virology **171**: 98-107
40. **Morris AP, Estes MK** (2001) Microbes and Microbial Toxins: Paradigms for Microbial-Mucosal Interactions, VIII. Pathological consequences of rotavirus infection and enterotoxin. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **281**: G303-G310
41. **Murray CJ, Lopez A** (1997) Global mortality, disability, and the distribution of risk factors: Global Burden of Disease study. Lancet **349**:1436-1442
42. **Musalem C, Espejo RT** (1985) Release of progeny virus from cell infected with simian rotavirus SA11, J Gen Virol **66**: 2715-2724
43. **Newton K, Meyer JC, Bellamy AR, Taylor JA** (1997) Rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 alters plasma membrane permeability in mammalian cells. J Virol **71**: 9458-9465
44. **Patton JT** (1995) Review article: Structure and function of the rotavirus RNA-binding proteins. Journal of General Virology **76**:2633-2644
45. **Patton, JT** (1995) Structure and function of the rotavirus RNA-binding proteins. J Gen Virol **76**: 2633 – 2644
46. **Piron M, Delaunay T, Grosclaude J, Poncet D** (1999) Identification of the RNA- Binding, Dimerization, and eIF4GI- Binding Domains of Rotavirus Nonstructural protein NSP3. Journal of Virology **73** (7): 5411-5421

47. **Piron M, Vende P, Cohen J** (1998) Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4GI and evicts the poly-(A) binding protein from eIF4GI. *The EMBO Journal* **17**: 5811-5821
48. **Poncet D, Aponte C, Cohen J** (1993) Rotavirus protein NSP3 is bound to the 3'-end consensus sequence of viral mRNA in infected cells. *J Virol* **67**:3159-3165
49. **Prasad BV and Estes MK** (1997) Molecular basis of rotavirus replication: structure-funcion correlations, in: *Structural biology of viruses*, Oxford Press. England, pag 239-268
50. **Prasad BV, Rothnagel R, Zeng QY, Jakara J, Lawton JA** (1996) Visualization of ordered genomic RNA and localization of transcriptional completes in rotavirus. *Nature (London)* **382**: 471-473
51. **Qian Y, Jiang B, Saif LJ, Kang SY, Ojeh CK, Green KY** (1991) Molecular analysis of the gene 6 from a porcine group C rotavirus that encodes the NS34 equivalent of group A rotaviruses. *Virology* **184**:752-757
52. **Sachs AB, Wahle E** (1993) Poly (A) tail metabolism and fuction in eucaryotes. *J Biol Chem* **268**: 22955-22958
53. **Stirzaker SC, Whitfeldpl, Chistie DT** (1987) Processing of rotavirus glycoprotein VP7: Implications for the retention of the protein in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **105**:2897-2903
54. **Su CQ, Wu YL, Shen HK et al.,** (1985) An outbreak of epidemic diarrhoea in adults caused by a new rotavirus in Anhui Province of Chine in the summer of 1983. *J Med Virol* **85**:25-34
55. **Tian P, Bail JM, Zeng CQ, Estes MK** (1996) The rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 posses membrane destabilization activity. *J Virol* **70**: 6973-6981
56. **Valenzuela S, Pizarro J, Sandino AM et al.,** (1991) Photoaffinity labeling of rotavirus VP1 with 8-azido-ATP: identification of the viral RNA polymerase. *J Virol* **65**: 3964-3967

57. **Vende P, Piron M, Castagne N, Poncet D** (2000) Efficient translation of rotavirus RNA requires simultaneous interaction NSP3 with the eukaryotic translation initiation factor eIF4G and the mRNA 3' end. *J Virol* **74**: 1431-1441
58. **Ward RI, Bernstein DI, Young EC** (1986) Human rotaviruses studies in volunteers. Determination of infectious dose and serological response to infection. *J Infect Dis* **154**: 871-880
59. **Yager M, Dryden KA, Olson NH, Greenberg HB, Baker TS** (1990) Three dimensional structure of reovirus by cryomicroscopy and image reconstruction. *J Cell Biol* **110** (6): 2133-2144
60. **Yisreli JK, Sokol S, Melton DA** (1990) A two- step model for the localization of maternal RNAm in *Xenopus* oocytes; involvement of microtubules and microfilaments in the translocation and anchoring of RNAm. *Development* **108**: 289-298
61. **Zapikian ZA** (1998) *Viral Infections of the Gastrointestinal Tract*, second edition, Marcel Dekker Inc. USA, pag 169-228