

00322

219



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**"MANIPULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA  
DE LA GLICOPROTEÍNA VP7 DE LOS ROTAVIRUS"**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**B I O L O G A**

P R E S E N T A:

**MARGARITA LAURA ZAYAS LÓPEZ**

DIRECTORA DE TESIS: DRA. SUSANA LÓPEZ CHARRETÓN



2003



FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR

A



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Margarita Laura Zayas López

FECHA: 21. Nov. 03

FIRMA: [Signature]

**DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA**  
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Manipulación de la expresión genética de la glicoproteína VP7 de los rotavirus"

realizado por Margarita Laura Zayas López

con número de cuenta 9529656-8 , quién cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis  
Propietario

Dra. Susana López Charretón

Propietario

Dra. Patricia Ileana Joseph Bravo

Propietario

Dr. José Luis Puente García

Suplente

Dr. Ernesto Méndez Salinas

Suplente

Dr. Pavel Isa

Consejo Departamental de Biología

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA  
DE BIOLOGÍA

***Dedicada a Lydia y Reynalda Piña***

Agradezco

A la Dra. Susana López por la enseñanza, la confianza y sobre todo, por el apoyo que me ha brindado para el desarrollo de mi formación académica. Al Dr. Carlos Arias por los consejos y comentarios en toda mi estancia en el laboratorio.

A la Dra. Minerva Camacho, por la paciencia, las risas, las peleas, la amistad y porque sin ella este trabajo no se hubiera realizado.

A Pedro Romero y Jimena por la asistencia que tuvieron en el desarrollo de este trabajo y por ser siempre tan amables conmigo.

A mis sinodales, Dra. Patricia Joseph, Dr. Ernesto Méndez, Dr. José Luis Puente y Dr. Pavel Isa por aceptar revisar mi tesis, por los comentarios y sugerencias.

A todos mis cuates: Alejandra, Aleyda, Amanda, Bato, Bibiana Blue, Billo, Cecilia, Cesar, Ciro, Claudia, Cris, Diana, Gallo, Hozeilah, Ismael, Ivan, Lalo, Laura, Mariana, Mariana Gtz, Merrick, Michel, Miriam, Mono, Noemi, Paola, Paula (muchas gracias), Pillo, Rafa, Sandra, Saul (por estar conmigo), Sioux, Tatiana, Ulises, Vergara, Verónica, que conste que van en orden alfabético. Gracias por brindarme su amistad y su confianza.

Al grupo Arias/Lopez : Margarito, Hilda, Maurico, Diana, Pedro Gama, Marisol, Vanessa, Mary, Teresa, Carlos Estrada, Rafa, Alejandro, Liliana, Claudia, Tomas, por la armonía que le dan al laboratorio.

Al grupo de los miércoles: Argel, Álvaro, Alejandro, Aleph, Javier, Ángel, Cristian, Rocio, Blanca, y los que me faltan .

A mi Familia, en particular a mis Tíos que siempre me han apoyado y sobre todo a mi Madre y a mi Abuela.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# ÍNDICE

<b>Introducción</b>	<b>1</b>
<b>Objetivos</b>	<b>19</b>
<b>Materiales y métodos</b>	<b>20</b>
<b>Resultados y discusión</b>	<b>36</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>61</b>
<b>Perspectivas</b>	<b>62</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>63</b>

## I. Introducción

### Generalidades

Los rotavirus fueron inicialmente caracterizados como agentes causantes de gastroenteritis en animales; sin embargo, numerosos estudios epidemiológicos también han demostrado que son la causa más importante de gastroenteritis severa en niños menores de dos años. Aunque los adultos también pueden infectarse, la infección en ellos es menos severa (32).

Los rotavirus componen un género dentro de la familia *Reoviridae*. Entre sus características más sobresalientes están: 1) el genoma se conforma por 11 segmentos de RNA de doble cadena (RNA<sub>dc</sub>) que codifican para seis proteínas no estructurales (NSP1, 2, 3, 4, 5 y 6) y seis proteínas estructurales (VP1, 2, 3, 4, 6 y 7); 2) las partículas virales maduras tienen una simetría icosaédrica, miden aproximadamente 100 nm de diámetro y están formadas por tres capas concéntricas de proteínas; 3) las partículas virales contienen una RNA polimerasa dependiente de RNA, responsable de transcribir y replicar el genoma; 4) el genoma segmentado de estos virus es capaz de rearrreglarse genéticamente; 5) la replicación del virus ocurre en el citoplasma de las células infectadas; 6) el tratamiento con enzimas proteolíticas facilita el cultivo del virus *in vitro*; 7) estos virus tienen una ruta morfogénica muy particular: las partículas virales inmaduras geman hacia el interior del retículo endoplásmico (RE) donde llevan a cabo su maduración; 8) los rotavirus maduros no tienen envoltura lipídica y se liberan de las células infectadas por la lisis celular o por el transporte vesicular no clásico en células epiteliales polarizadas (17).

Los rotavirus se clasifican serológicamente en varios grupos (serogrupos) que constan de múltiples serotipos. Cada serogrupo está conformado por rotavirus que comparten antígenos detectados por pruebas serológicas. Hasta ahora los rotavirus se han

clasificado en siete grupos (A a G). Los grupos A, B y C son más comúnmente encontrados en humanos y animales, mientras que los grupos D, E, F y G han sido hallados sólo en animales. El genoma de los virus se puede reorganizar entre los miembros de cada grupo; sin embargo, esto no sucede entre virus de diferentes grupos (17, 71). Los determinantes antigénicos característicos de cada grupo están dados por las proteínas estructurales. Los rotavirus del grupo A son los principales causantes de gastroenteritis infecciosa en niños. Los rotavirus del grupo B se han asociado a epidemias anuales de diarreas severas principalmente en adultos. El grupo C se ha detectado esporádicamente en heces fecales de niños con diarrea y en brotes severos, principalmente en China (17, 62).

Los grupos de rotavirus se clasifican en diferentes serotipos y genotipos. Los primeros se han caracterizado por ensayos de neutralización con anticuerpos policlonales; mientras que los segundos, están determinados por análisis de hibridación, o por la secuencia de los diferentes genes. La clasificación de los rotavirus se basa en un sistema binario. En éste, los diferentes serotipos de VP4 y de VP7 se reconocen por los epítopes de neutralización que presentan estas dos proteínas de la capa externa. Se han clasificado 14 serotipos G y 13 serotipos P (incluyendo 3 subtipos) con base en la glicoproteína VP7 y en la proteína VP4, respectivamente. Al clasificar un rotavirus se debe incluir ambos serotipos, por ejemplo: la clasificación de la cepa humana Wa es: Wa (hu) G1/P1A (13, 17, 27, 37).

### **Características de la partícula viral**

Estudios realizados por microscopía electrónica (ver Figura 1) han permitido observar tres tipos de partículas: las partículas que presentan una sola capa denominada nucleocápside o core, las partículas formadas por dos capas proteicas o DLP's (double-layered particles) y las partículas maduras formadas por las tres capas de proteínas o TLP's (triple-layered particles). Las nucleocápsides están conformadas por 120 moléculas de la

proteína VP2 arreglada como 60 dímeros que envuelven al genoma y a pequeñas cantidades de las proteínas VP1 y VP3. Cada nucleocápside posee una simetría T=1 y no es infecciosa. Las DLP's constan de una nucleocápside cubierta por una capa formada por 780 moléculas de la proteína VP6 en un arreglo de simetría icosaédrica T=13. Esta partícula no es infecciosa pero es activa en transcripción. La proteína VP6 puede disociarse de las DLP's si éstas son tratadas con agentes caotrópicos como el  $\text{CaCl}_2$  y el  $\text{NaSCN}$ . Las partículas infecciosas son las TLP's. Éstas presentan tres capas concéntricas de proteínas. La tercera capa de estas partículas está conformada por 60 espículas de la proteína VP4 que se proyectan a lo largo de una superficie lisa formada por trímeros de la glicoproteína VP7, que envuelven a las DLP's. Esta capa externa puede ser removida por agentes quelantes como el EDTA o EGTA, perdiendo así la infectividad (17, 19, 58, 59).

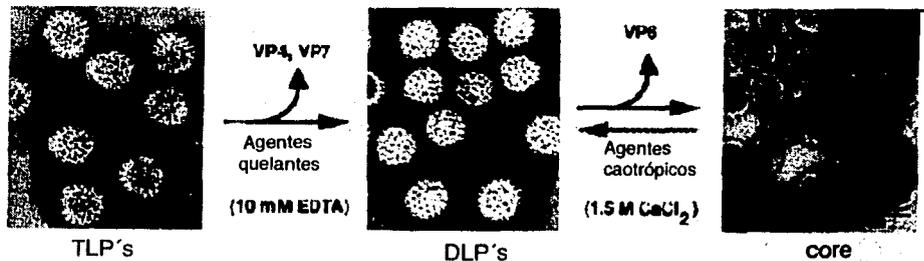


Figura 1. Microscopía Electrónica de las partículas virales. La barra representa 100nm. en gr (tomada del libro de Virology de Fields *et al* (17).

s y valores de sedimentación. Las TLP's tienen una densidad de  $1.36 \text{ g/cm}^3$  en gradientes de  $\text{CsCl}$  y un coeficiente de sedimentación de 520S a 530S en gradientes de sacarosa; mientras que las DLP's tienen una densidad de  $1.38 \text{ g/cm}^3$  y un coeficiente de sedimentación de 380S a 400S. Las nucleocápsides tienen una densidad de  $1.44 \text{ g/cm}^3$  en  $\text{CsCl}$  y un coeficiente de sedimentación de 280S en sacarosa (8, 17).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Genoma

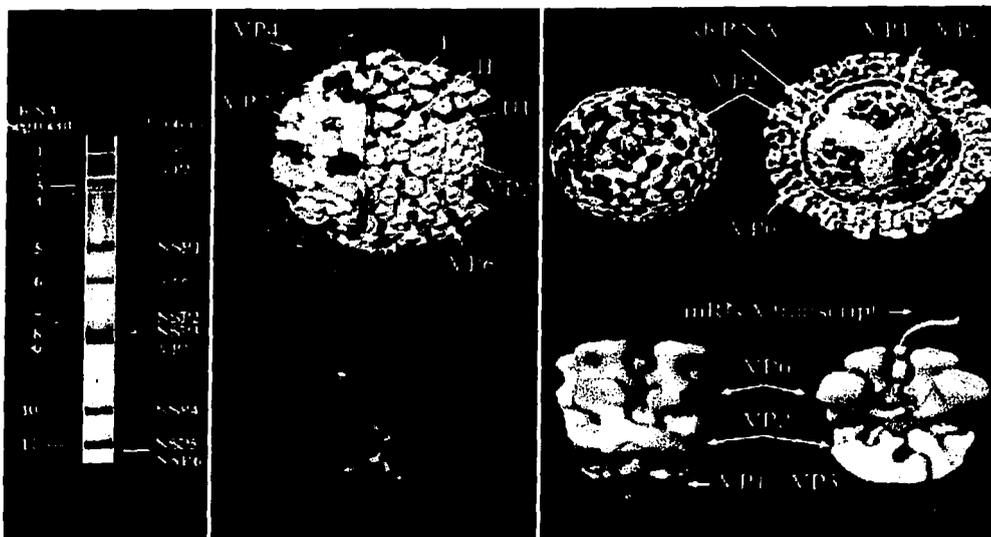
El genoma viral está constituido por 11 segmentos de RNAdc contenidos dentro de la nucleocápside. Los tamaños de cada segmento varían desde 660 pb del gen más pequeño hasta 3300 pb para el gen más grande (ver tabla 1 y figura 2). Cada segmento codifica para una proteína a excepción del segmento 11 que presenta dos marcos abiertos de lectura que codifican para dos proteínas no estructurales (NSP5 y NSP6). De las doce proteínas: seis son proteínas estructurales que forman a las partículas virales y seis son proteínas no estructurales que se sintetizan en las células infectadas y que no están presentes en la partícula madura. Estas proteínas no estructurales participan en la replicación del virus y en la morfogénesis de la partícula viral (3).

**Tabla 1. Asignamiento génico y funcional de Rotavirus**

Gen	Tamaño (bp)	Proteína	Peso Molecular (kDa)	Localización en Partículas	No. De copias por partículas	FUNCIÓN
1	3,302	VP1	125	NC	12	RNA polimerasa dependiente de RNA
2	2,690	VP2	94	NC	120	Unión a RNA, formación de nucleocápside
3	2,591	VP3	88	NC	12	Guanilil-transferasa
4	2,362	VP4	88	TLP	120	Proteína de unión a la célula
5	1581	NSP1	53	NS	0	Unión a RNA, proteína más variable del género
6	1356	VP6	41	DLP	780	Contiene determinantes antigénicos de grupo y subgrupo
7	1104	NSP3	34	NS	0	Unión a eIF-4G, unión al extremo 3' de los genes virales
8	1059	NSP2	35	NS	0	Unión RNA, probable actividad de NTPasa
9	1062	VP7	38	TLP	780	Glicoproteína con determinantes antigénicos de serotipo
10	751	NSP4	28	NS	0	Enterotoxina, receptor en RE
11	667	NSP5	26	NS	0	Posible cinasa autocatalítica
		NSP6	10	NS	0	Producto del ORF2 del gen 1, proteína hiperfosforilada

NC nucleocápside  
 TLP Partícula con tres capas  
 DLP Partícula con dos capas  
 NS Proteína no estructural

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



**Figura 2.** Asignamiento genético y representación tridimensional de la estructura de las partículas de rotavirus. En el panel A se muestra un gel de poliacrilamida donde se observan los 11 segmentos de RNA del genoma de SA11 y las proteínas codificadas por cada segmento. En el panel B, se muestra la estructura tridimensional de la partícula viral en donde se observan las capas: externa (conformada por VP4 y VP7), intermedia (VP6) e interna (VP2); así como los tres tipos de canales que se observan en las DLP's (I, II y III). También se ilustra la estructura de una espícula de VP4, donde se observa la naturaleza dimerica de la espícula. En el panel C, arriba se observa la estructura tridimensional de la nucleocápside. Abajo se ilustra el complejo enzimático conformado por VP1 y VP3, y el RNA viral naciente el cual sale a través de un canal de tipo I formado por VP2 y VP6 (tomada del libro de Virology de Fields *et al* (17).

### Proteínas no estructurales

El genoma de los rotavirus codifica para seis proteínas no estructurales (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 y NSP6), las cuales están involucradas en la replicación (NSP1 a 3, 5, 6) y en morfogénesis (NSP4). **NSP1** no se ha identificado el papel de esta proteína durante la replicación y es la menos conservada de todas las proteínas virales. **NSP2** es una NTPasa oligomérica que se localiza en los viroplasmias y probablemente está involucrada en la encapsidación del RNA en la partícula y en la virulencia. **NSP3** se une al 3' del RNA viral funcionando de manera similar a la proteína celular PABP (poly(A)-binding protein):

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

se une al factor de la iniciación de la traducción eIF4G e inhibe la síntesis de proteínas celulares, y de esta forma se favorece la traducción de los RNAm virales. **NSP5** es una fosfoproteína *O*-glicosilada que forma dímeros, presenta una actividad de autocinasa y diferentes estados de fosforilación en células infectadas, pero hasta la fecha no se ha establecido su función durante el ciclo replicativo del virus. **NSP6** es codificada por un marco abierto de lectura alternativo del gen 11; se sabe que interactúa con NSP5 y que se acumula en los viroplasmos. **NSP4** es la única proteína no estructural que no se une al RNA viral. Es una N-glicoproteína que reside en el RE funcionando como un receptor intracelular y presenta un dominio carboxílico terminal que se une a las DLP's interactuando directamente con VP6. Al parecer, la interacción con VP6 media la gemación de las DLP's hacia el interior del RE, donde las partículas adquieren una cubierta lipídica. Se ha propuesto que NSP4 puede estar involucrada en la remoción de la envoltura de membrana durante la morfogénesis viral por algún mecanismo que aún no se ha descrito. Esta proteína también actúa como virotoxina, ya que incrementa la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular como parte del mecanismo de muerte celular inducido por la infección con rotavirus (3, 64, 65).

## **Proteínas estructurales**

### **1) Proteínas de la nucleocápside**

La nucleocápside está formada por las proteínas VP1, VP2 y VP3, estas proteínas estructurales tienen una alta afinidad por RNA de cadena sencilla, aunque sólo se ha demostrado que VP1 presenta un sitio de reconocimiento secuencia específica al RNA viral (41).

**VP1** es, además, la RNA polimerasa viral y funciona como transcriptasa, sintetizando los RNA's mensajeros, y como de replicasa, sintetizando las hebras

complementarias del RNAm. La secuencia de la proteína VP1 presenta cuatro motivos conservados entre las RNA polimerasas dependientes de RNA. VP1 no funciona por si sola sino que requiere que VP2 esté presente para llevar a cabo su actividad de replicasa (50). **VP2** es una proteína que se une al RNA de manera inespecífica. Es la proteína que da estructura al core del virión y es importante durante la replicación debido a que se puede unir al RNAm (9). **VP3** se une al extremo amino terminal de la proteína VP2 y también se une preferencialmente al extremo 5' de los RNA's mensajeros. Esta proteína tiene actividad de guanilil-transferasa siendo la responsable de añadir el CAP a los RNA's mensajeros virales (3, 36).

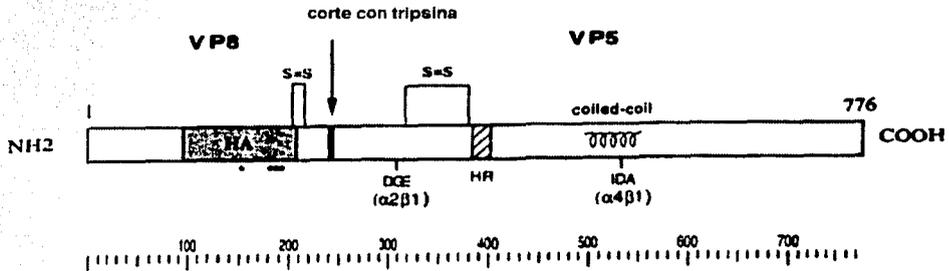
## **2) Proteína de la capa intermedia**

**VP6**, de 397 aminoácidos, es la proteína estructural más abundante de los viriones. Es una proteína hidrofóbica altamente antigénica e inmunogénica; juega además un papel clave en la estructura de los viriones dado que forma la capa intermedia de las partículas virales, presentando interacciones tanto con las proteínas de la capa externa, VP4 y VP7, como con la proteína VP2 de la nucleocápside. VP6 forma trímeros espontáneamente y es extremadamente estable en esta conformación (17, 18).

## **3) Proteínas de la capa externa**

**VP4** es una proteína de 776 aminoácidos con un peso molecular de 88 kDa. Esta proteína se corta con tripsina generando dos polipéptidos: **VP8** que abarca de los aminoácidos 1 al 231, que presenta un peso molecular de 28 kDa; y **VP5** que abarca los aminoácidos 247 a 776, con un peso molecular de 60 kDa. Estos polipéptidos representan los extremos amino y carboxilo terminal respectivamente. El corte con tripsina de VP4 aumenta la penetración del virus a la célula pero no la unión a su receptor celular. Los cortes

con tripsina se dan en las argininas 231, 241, y 247. Estas argininas se encuentran conservadas en todas las secuencias de VP4 de los rotavirus hasta ahora reportadas. Se ha relacionado el corte de la Arg 247 con el incremento de la infectividad (6, 22, 38).



**Figura 3.** Esquema de las propiedades de la proteína estructural VP4. La región donde se encuentran los sitios de corte con tripsina se muestra ( $\downarrow$ ), la cual define el límite entre VP8 y VP5. El dominio de hemaglutinación (HA) (aa 93 a 208), los asteriscos marcados por debajo del dominio HA indican los aa 150 y 188 al 190, los cuales son importantes para la unión a ácido siálico (AS) de esta proteína. Los puentes disulfuro entre las Cys 203 y Cys 216, y entre las Cys 318 y Cys 330, se indican como S=S. En VP5, se muestra la posición de las secuencias DGE e IDA, que son motivos de unión, y podrían ser reconocidos por las integrinas  $\alpha 2\beta 1$  y  $\alpha 4\beta 1$ , respectivamente. Se muestra la región hidrofóbica (HR), la cual ha sido propuesta como un posible dominio de fusión, y un dominio de "coiled coil".

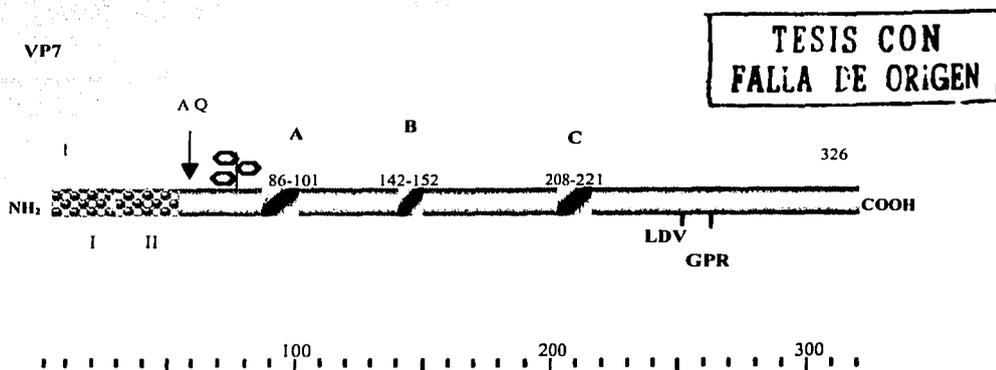
Diferentes estudios indican que la proteína VP4 de los rotavirus animales tiene dos enlaces disulfuro intracadena: uno en VP8 y otro en VP5, mientras que la proteína VP4 de los rotavirus humanos parecen tener un solo enlace disulfuro presente en la proteína (49). La proteína VP4 de origen animal tiene la capacidad de aglutinar eritrocitos *in vitro*. A esta actividad se le llama hemaglutinación y está directamente relacionada con la capacidad de unión del virus al ácido siálico (AS) presente en las membranas de los eritrocitos. Esta actividad no se encuentra en las proteínas VP4 de origen humano.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Como se observa en la figura 3, el dominio de hemaglutinación (HA) en VP4 comprende los aminoácidos 93 a 208 (20) de la proteína VP8 siendo los aminoácidos 155 y 188-190 los más importantes en la actividad de unión a ácido siálico (AS) (28). Los puentes de disulfuro entre la Cys 203 y la Cys 216, y entre la Cys 318 y la Cys 380 se encuentran indicados por S=S. En el dominio de VP5 se encuentran las secuencias consenso Asp/Gly/Glu (DGE, entre los aminoácidos 308 a 310) y la secuencia Ile/Asp/Ala (IDA) de unión a integrinas de  $\alpha 2\beta 1$  y  $\alpha 4\beta 1$ , respectivamente (26). También en VP5 se encuentra una región altamente hidrofóbica (HR) entre los aminoácidos 384 a 401, la cual se ha propuesto que funciona como un péptido de fusión a la membrana celular (40).

VP7 es una proteína estructural de 326 aminoácidos, tiene un peso molecular de 37 kDa y es codificada por el segmento de RNA 7, 8 o 9 dependiendo de la cepa del rotavirus. Análisis bioquímicos han determinado que VP7 es una glicoproteína que contiene sólo N-oligosacáridos de alta manosa (5, 30). Durante las reacciones de N-glicosilación, una glucosa<sub>3</sub>-manosa<sub>9</sub>-N-acetilglucosamina<sub>2</sub> (Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>) es transferida del dolicol-fosfato a un residuo de asparagina de la cadena polipeptídica nascente. Para la VP7 intracelular, los residuos de oligosacáridos que se encuentran predominantemente son Man<sub>8</sub>GlcNAc<sub>2</sub> y Man<sub>6</sub>GlcNAc<sub>2</sub>; mientras que el oligosacárido Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub> se encuentra en la VP7 de las partículas virales maduras (30, 31). Un péptido señal que se localiza en el extremo amino terminal de la proteína VP7 la dirige al RE, en donde es modificada cotraduccionalmente siendo glicosilada mientras se va insertando dentro de la membrana del RE. VP7 no se transporta del RE al aparato de Golgi, donde en general se adicionan azúcares más complejos (31), sino que es retenida en el lumen del RE. En la cepa de rotavirus de simio SA11, la proteína VP7 posee un solo sitio de glicosilación que se

encuentra en el aminoácido 69. Otras cepas virales contienen tres sitios potenciales de glicosilación de los cuales aparentemente sólo dos son usados (17).



**Figura 4.** Esquema de las propiedades estructurales de VP7. Se muestran los dos dominios hidrofóbicos I y II. Las regiones marcadas como A (aa 86-101), B (142-152) y C (208-221) son epitopos de neutralización. El sitio de procesamiento en el RE ( $\downarrow$ ). Se muestra la posición de las secuencias LDV y GRP, que son motivos de sitios de unión, a las integrinas  $\alpha 4\beta 1$  y  $\alpha x\beta 2$ ,

En base al análisis de secuencias de aminoácidos de la proteína VP7 de distintas cepas de rotavirus animales y humanos, se han identificado ciertas características con posible relevancia biológica (ver figura 4). El marco abierto de lectura de 326 aminoácidos comienza con un codón de inicio que presenta una secuencia consenso Kozak. Existe también un segundo codón de inicio en fase que se encuentra 30 codones *rio abajo* del primer codón de inicio. Los dos codones de inicio preceden dos regiones hidrofóbicas (H1 y H2), que pueden actuar como secuencias señal para dirigir a VP7 hacia el RE. Un tercer codón de inicio en fase se localiza *rio abajo* del segundo dominio hidrofóbico y se encuentra presente sólo en algunas cepas (54).

La proteína VP7 es procesada por la señalasa en la secuencia del péptido señal entre la Ala-50 y la Gln-51, perdiéndose así los dominios H1 (aa 1 a 29) y H2 (aa 30 a 50) de la

proteína madura (3, 57). De este modo el residuo que se encuentra en el amino terminal de la proteína madura es la glutamina 51.

Muchas proteínas residentes del lumen del RE tienen la secuencia de aminoácidos KDEL (Lys/Asp/Glu/Leu) en el extremo carboxilo, lo que determina su retención en el RE. La proteína VP7 no contiene la secuencia KDEL y hasta ahora no ha sido muy clara la identificación de las regiones de la proteína que le permiten la retención en el lumen del RE. Se han encontrado dos secuencias altamente conservadas que podrían servir para este fin: la secuencia **LPXTGS** (donde X puede ser cualquier aminoácido) localizada entre los aminoácidos 57 y 63 en el extremo amino terminal (17); y la secuencia **MSKRSRS** entre los aminoácidos 292 a 311 en el extremo carboxilo terminal (12). Se ha propuesto que VP7 presenta una orientación luminal, ya que la proteína es protegida cuando microsomas intactos son incubados con tripsina (30). La maduración de la proteína VP7 depende de la formación de puentes disulfuro intramoleculares. Se requiere de ATP para los puentes se formen y para que la proteína se pliegue correctamente (46). La estabilidad de la proteína depende del ion  $Ca^{2+}$ , aunque el sitio de unión a éste aún no se ha localizado directamente. Mediante análisis de secuencia se ha propuesto que se podría ubicar entre los aminoácidos 124 a 155, o bien en dos residuos de prolina (aminoácidos 75 y 279) que se encuentran también involucrados en la actividad de unión a calcio (21). VP7, NSP4 y VP4 forman heterooligómeros, que podrían tener importancia durante la gemación de las DLP's hacia el lumen del RE, donde posteriormente ocurre la maduración hacia TLP's (39, 54, 55).

### **Modelo de las primeras interacciones de los rotavirus con sus receptores celulares**

Los rotavirus requieren interactuar con más de una molécula de la superficie celular para entrar a la célula. Durante este proceso usan diferentes dominios de la proteína VP4. La

cepa de rotavirus de simio RRV se une a una molécula celular que contiene ácido siálico (AS) a través del dominio HA de VP8. Aún no se ha determinado cuál es la molécula celular portadora de AS. Se ha propuesto a los gangliosidos GM1 o GM3 como posibles candidatos, aunque también se ha sugerido que los AS que presentan las integrinas podrían jugar este papel (ver figura 5). Posteriormente, el rotavirus RRV interactúa con un segundo coreceptor celular, la integrina  $\alpha 2\beta 1$ , a través de un motivo DGE que esta presente en la proteína VP5 (4, 75). Posiblemente esta unión a la integrina  $\alpha 2\beta 1$  a través de VP5 es favorecida por un cambio en la conformación de VP4 inducido por la primera interacción con AS (43). El rotavirus Nar3 es una variante proveniente de RRV que no requiere unirse inicialmente a AS y cuya infectividad no se afecta cuando se trata a las células con neuraminidasa (NA), una sialidasa que remueve los AS expuestos en la membrana de las células (42). Nar3 se une a la integrina  $\alpha 2\beta 1$  directamente, siendo ésta su primera interacción con la superficie celular. Por lo que se ha propuesto, que esta variante ya presenta un cambio conformacional en la proteína VP4 que le permite interactuar inicialmente con la integrina  $\alpha 2\beta 1$ , prescindiendo del primer contacto con AS (4, 75). La proteína de choque térmico hsc70 también está involucrada en la unión y reconocimiento de los rotavirus con su célula huésped ya que anticuerpos monoclonales contra esta proteína bloquean la infectividad del virus RRV y nar3, sin bloquear la unión del virus a la célula huésped; por lo que se propone que esta interacción es en un paso posterior a la unión de la célula huésped. La interacción del rotavirus con hsc70 es a través de una región localizada en el extremo carboxilo de la proteína VP5 (aminoácidos 642-659) (74). Por otra parte la integrina  $\alpha v\beta 3$ , también participa durante la entrada de los rotavirus en un paso post-unión; la unión de los virus a esta integrina está mediada por una región diferente a la que presentan sus ligandos

naturales. Estos últimos contienen en su secuencia un motivo RGD que es el responsable de la interacción con la integrina  $\alpha v\beta 3$ . Experimentos realizados en el laboratorio han demostrado que una región que se encuentra en VP7 (aa 161-169) es la responsable de esta unión específica a  $\alpha v\beta 3$ .

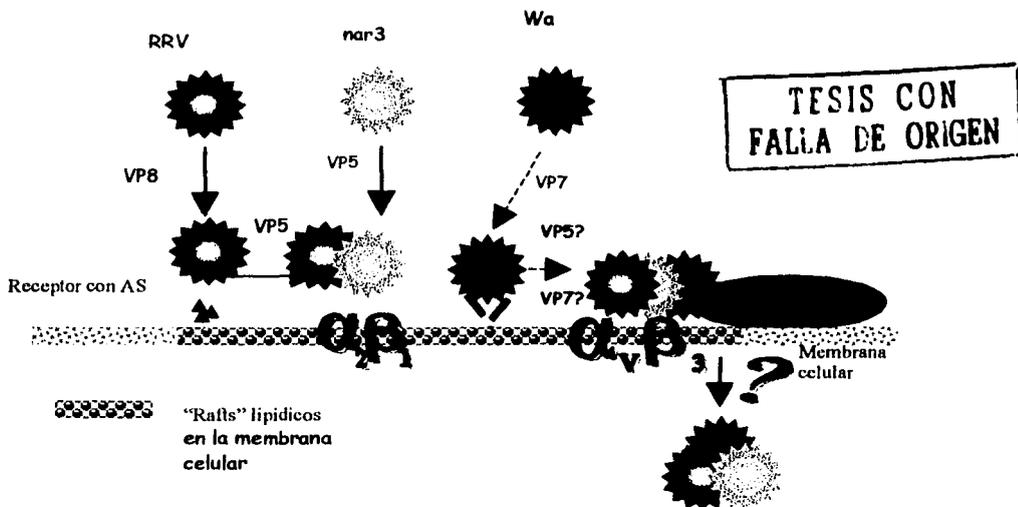


Figura 5. Modelo de las primeras interacciones de los virus RRV, nar3 y Wa con sus receptores celulares.

La cepa de origen humano Wa es una cepa que no requiere de AS para unirse a la célula (11, 42). Se ha propuesto que inicialmente se une a una molécula de la superficie celular que es usada por RRV y nar3 en un paso subsecuente a la interacción de estos virus con la integrina  $\alpha 2\beta 1$ . Wa no utiliza este receptor celular, sin embargo se sabe que este virus interactúa con la integrina  $\alpha v\beta 3$  y con la proteína Hsc70 en un paso posterior a su unión inicial (73).

Para estudiar el mecanismo de unión inicial de esta cepa, en nuestro laboratorio se realizaron ensayos de competencia de la unión del virus Wa con las proteínas de fusión GST-VP5 y GST-VP8 (del virus Wa) para determinar cual de estas dos proteínas era responsable de la primera interacción de este virus con la superficie celular, los resultados obtenidos demostraron que el virus Wa no utiliza ninguno de estos polipéptidos para su unión inicial a la célula, a diferencia de los virus de origen animal, que como ya se mencionó utilizan a VP8 y a VP5 para su unión inicial. A partir de este resultado y para estudiar a través de que proteína interacciona este virus con la superficie celular se realizaron ensayos de bloqueo, incubando al virus Wa con un anticuerpo policlonal dirigido contra este virus ( $\alpha$ Wa) y con anticuerpos monoclonales dirigidos contra las proteínas VP8, VP5 y VP7 (159, KU-4, 5E8 anticuerpos para VP7), se encontró que a diferencia de los rotavirus de origen animal, la unión del virus a la célula fue inhibida con los anticuerpos  $\alpha$ VP7. Estos resultados sugieren que la primera interacción del virus Wa con los receptores celulares es a través de la glicoproteína VP7 (69), por lo que en este trabajo nos propusimos sobreexpresar esta proteína en el sistema de expresión de baculovirus recombinante-células de insecto, ya que consideramos que contar con esta proteína recombinante será una herramienta importante para poder estudiar a la proteína VP7 de Wa y nos permitirá analizarla *in vitro*, para poder determinar las regiones necesarias para su unión a los receptores celulares, que hasta la fecha no han sido caracterizados.

### **El sistema de expresión BAC to BAC**

Los baculovirus recombinantes se usan como vectores de expresión de genes heterólogos en células de insecto. Los genes heterólogos son clonados bajo el control del

promotor de polihedrina, que es un promotor fuerte del virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV). El AcNPV pertenece a la familia *Baculoviridae*, y tiene un genoma de DNA circular de doble cadena de 130 kb. Estos virus presentan envoltura lipídica e infectan lepidópteros (47).

Las ventajas de usar el sistema baculovirus-recombinante-células de insecto como sistema de expresión de proteínas heterólogas son las siguientes:

1. Las proteínas recombinantes obtenidas en este sistema generalmente son solubles y fáciles de recuperar, a diferencia de las proteínas insolubles que frecuentemente son obtenidas en sistemas de expresión bacterianos.
2. La expresión en este sistema permite obtener proteínas con modificaciones postraduccionales como la glicosilación, en contraste con los sistemas bacterianos en los que las proteínas heterólogas no son modificadas.
3. AcNPV usualmente es propagado en líneas celulares de la especie *Spodoptera frugiperda*, que crece muy bien en cultivos en suspensión, lo cual permite que la producción de las proteínas recombinantes se realice a gran escala utilizando bioreactores.
4. AcNPV tiene un tropismo celular muy amplio lo que le permite propagarse en una gran variedad de líneas celulares de diferentes insectos.

### **Interferencia de RNA**

Por otro lado, con el objetivo de estudiar el papel de la proteína VP7 de RRV durante la morfogénesis viral, se empleo como herramienta la interferencia de RNA (RNAi), la cual involucra una serie de procesos celulares que inhiben de manera específica la expresión de

un gen debido a la degradación del RNAm de éste, evitando así la síntesis de la proteína. A este mecanismo se le conoce como silenciamiento post-transcripcional de genes o interferencia de RNA. El mecanismo de interferencia de RNA, se ha conservado evolutivamente en hongos, algas, plantas, insectos y en animales (25, 67).

Este fenómeno se describió recientemente y aún no se conoce en detalle todo el mecanismo a través del cual se da este proceso, sin embargo se sabe que como parte del proceso general de interferencia de RNA (ver figura 6), el RNA de doble cadena blanco es cortado por una enzima denominada Dicer, generando RNAs pequeños (siRNAs) de doble cadena de 21 a 26 pb con dos nucleótidos sobresalientes en los extremos 3' terminal de ambas cadenas (72). Estos siRNAdc se convierten a siRNAs de cadena sencilla (siRNAs) por la acción de una helicasa que forma parte de un complejo multienzimático denominado RISC (RNA-Induced Silencing Complex). Si estos siRNAs no reconocen a un RNAm blanco son inestables y se degradan rápidamente (61), en cambio si reconocen a su RNAm blanco (con el que son 100% complementarios) pueden suceder dos eventos. En el primero, estos siRNAs primarios sirven como "primers" o polinucleótidos iniciadores en la síntesis de RNA de doble cadena dirigida por una RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRP). El nuevo RNA de doble cadena sirve ahora como sustrato para Dicer produciendo siRNAs secundarios que amplifican la interferencia, fenómeno que se conoce como "efecto transitivo", es decir, ahora los siRNAs antisentido secundarios pueden hibridar en diferentes regiones del RNAm blanco (53). En *C. elegans* se ha observado que la distribución secundaria de estos siRNAs parece derivar de la acción de una RdRP celular utilizando como "primers" los siRNAs antisentido primarios para sintetizar RNAdc sólo hacia la dirección 5' del RNAm blanco (1, 61). En contraste, en plantas se ha encontrado que el RNA de doble cadena es degradado por Dicer generando siRNAs primarios que

sirven como “primers” para la RdRP, tanto hacia el extremo 5' como al extremo 3' del RNAm blanco generando siRNAs secundarios antisentidos de ambos extremos del RNAm (68). En el segundo evento posible, el RNAm blanco es cortado por una endonucleasa, la cual depende de reconocimiento de una secuencia específica y que forma parte del complejo RISC, aproximadamente a la mitad de la secuencia reconocida, el proceso de degradación completa del RNAm se da por una exonucleasa no específica celular que no forma parte del complejo RISC (24).

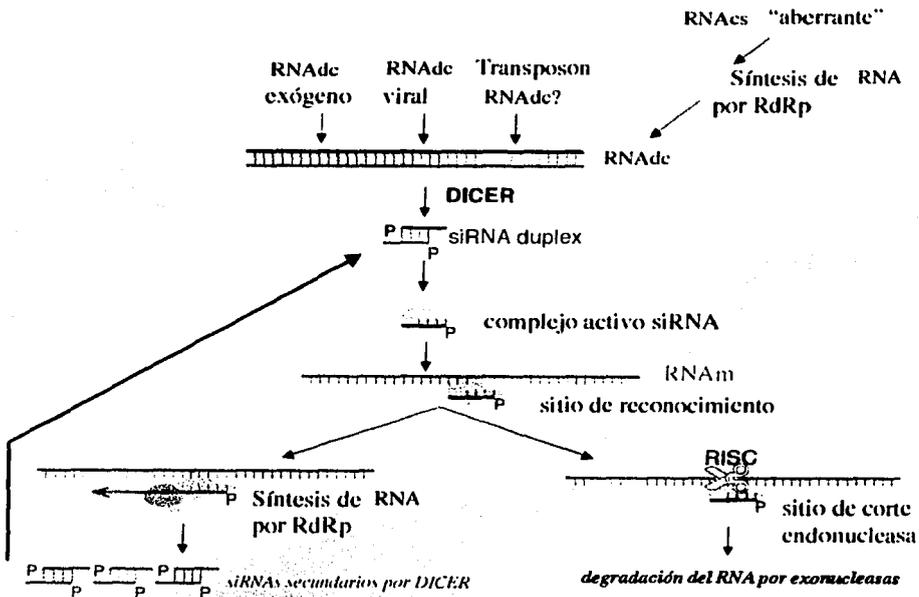


Figura 6. Modelo que esquematiza los pasos moleculares en la interferencia del RNA. Modificado de Ahlquist. (1)

En células de mamífero el RNAdc puede ser procesado a siRNAs, sin embargo la interferencia de RNA con los RNAdc mayores a 30 nt no ha sido exitosa en muchos tipos celulares debido a que se pueden activar el sistema de PKR que involucra cinasas dependientes de RNAdc y la 2'-5'-oligoadenilato sintetasa que normalmente es inducida por

IFN. La actividad de PKR inhibe la traducción en general por la fosforilación del factor  $2\alpha$ , de traducción eucariontes, mientras que la 2'-5'-oligoadenilato sintetasa causa degradación no específica de RNAm al activar la vía de la Rnasa L (70). Recientemente se ha observado que la transfección de siRNAs dúplex sintéticos de 21 nt dentro de células de mamífero inhibe eficientemente genes endógenos de manera específica, estos siRNAs dúplex son tan cortos que no disparan respuestas inespecíficas debido a RNA's de doble cadena mayores de 30 nt (29).

## **OBJETIVOS**

**-Expresar la glicoproteína VP7 de la cepa de rotavirus humano Wa, utilizando el sistema, baculovirus-recombinante-células de insecto.**

**-Inhibir la expresión de la glicoproteína VP7 de la cepa de rotavirus de simio RRV, utilizando como herramienta la interferencia de RNA.**

## MATERIALES Y MÉTODOS

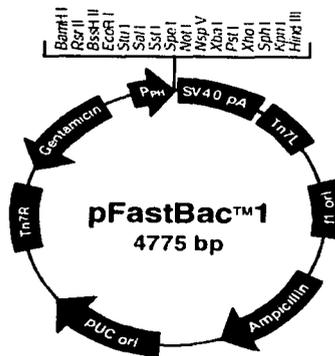
### Líneas celulares y virus

Se utilizó la línea celular MA104 derivada de células epiteliales de riñón del mono *Rhesus*. Las células se crecieron en medio mínimo esencial de Eagle (MEM) (Sigma), suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco), a 37 °C y en un ambiente húmedo, con 5% de CO<sub>2</sub>. También se utilizó la línea celular Sf9 de la especie *Spodoptera frugiperda*, la cual crece en medio SF900II (Invitrogen), a 27 °C y con 5% de CO<sub>2</sub>.

La cepa de rotavirus de humano Wa y la cepa de rotavirus de mono *Rhesus* RRV fueron originalmente donados por H.B. Greenberg de la Universidad de Stanford, California.

### Vectores de clonación

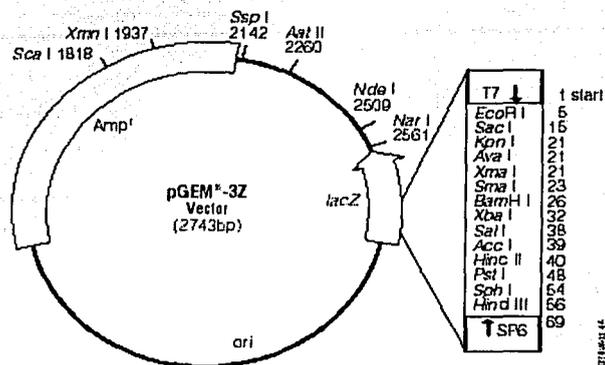
En este trabajo se utilizó el plásmido de transferencia pFastBac1 (Invitrogen) como intermediario para clonar genes heterólogos en baculovirus (ver figura 7) y el plásmido pGEM-3Z (Promega) para clonar los genes de VP7 de los rotavirus de RRV y Wa (ver figura 8).



TEXTO CON  
FALLA DE ORIGEN

Origen fl: 2 – 457 pb  
Gene de resistencia a ampicilina: 589–1449 pb  
Origen pUC: 1594–2267 pb  
Tn7R: 2511–2735  
Gene de resistencia a Gentamicina: 2802–3335 pb  
(hebra complementaria)  
Promotor de Polihedrina (PPH): 3904–4032 pb  
Sitios múltiples de clonación: 4037–4142 pb  
Señal de poliadenilación de SV40: 4160–4400 pb  
Tn7L: 4429–4594 pb

Fig. 7. Esquema del vector pFastBac1



Sitio de inicio de transcripción de la T7 RNA polimerasa	1
Sitio de inicio de transcripción de la SP6 RNA polimerasa	69
Promotor de la T7 RNA polimerasa (-17 a +3)	2727-3
Promotor de la SP6 RNA polimerasa (-17 a +3)	67-86
Sitio múltiple de clonación	5-61
Codón de inicio lacZ	108
Secuencias del operón de lacZ	2561-2724;94-323
Operador lacZ	128-144
β-lactamasa (Amp <sup>r</sup> ) región codificante	1265-2125

**Fig 8. Esquema del vector pGEM-3Z**

### Obtención de DNA complementario (DNAC) de VP7 de Wa y de RRV por RT-PCR

Las células MA104 se crecieron en monocapas a confluencia en cajas de 6 pozos. Las células se infectaron con rotavirus de la cepa Wa o de RRV, a una multiplicidad de infección de 10 virus/célula; 7 horas post-infección las células se lavaron con MEM sin suero, y se lisaron utilizando 1 ml de trizol (Gibco BRL) por pozo, el RNA se extrajo con cloroformo y se precipitó con isopropanol. El RNA se lavó dos veces con etanol absoluto y se resuspendió en 15 µl de H<sub>2</sub>O libre de RNasas. Para realizar la reacción de transcripción reversa se tomaron 3 µl del RNA total más 1 µl del oligonucleótido 3' (1 pM/µl) y 1 µl de H<sub>2</sub>O, esta mezcla se hirvió por tres minutos y se le adicionó 15 µl de la mezcla de reacción

para transcriptasa reversa (4  $\mu$ l de amortiguador 5X para transcriptasa reversa, 2  $\mu$ l de dNTP's 5 mM, 2  $\mu$ l de DTT 0.1 M, 6.2  $\mu$ L H<sub>2</sub>O, 0.5  $\mu$ l RNAsin y 0.3  $\mu$ l Superscript II), y se incubó por 1 hr a 37 °C. El DNAc se extrajo con fenol/cloroformo y se precipitó con etanol absoluto y acetato de sodio, la pastilla se lavó dos veces con etanol absoluto y se resuspendió en 12.5  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó utilizando 0.2  $\mu$ l del DNAc más 1.8  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O y 1  $\mu$ l de los oligonucleótidos 5' y 3' (ver tabla 1) a una concentración de 50 pM/ $\mu$ l y 21  $\mu$ l de la mezcla reacción (1  $\mu$ l dNTP's 5 mM, 2.5  $\mu$ l de amortiguador 10X Vent, 17.2  $\mu$ l H<sub>2</sub>O y 0.3  $\mu$ l de Vent polimerasa).

Las condiciones de la PCR fueron:

1 x 2' -94 °C,  
 30 x  $\left\{ \begin{array}{l} 30'' - 94 \text{ °C} \\ 30'' - 55 \text{ °C} \\ 2' - 72 \text{ °C} \end{array} \right.$   
 1x 3' -72 °C.

**Tabla 1. Oligonucleótidos para gen 9**

YM9-3'	CAGACCCGGGCCGCGGTACATCATAACAATTC
YM9-5'	CAGACCCGGGTACCTTTAAAAGAGAGAATTTCC

Los oligos YM9-3' y YM9-5' dejan sitios *Sma*I (CCCGGG) en los extremos del gen

### **Transformación del pFastBac1-VP7Wa en células DH10Bac**

Se descongelaron células competentes DH10Bac en hielo y se pasaron 50  $\mu$ l de células a tres tubos de polipropileno (Falcon) de 15 ml, se le añadió a cada tubo 5 ng, 10 ng o 30 ng de pFastBac-VP7 Wa, la mezcla se incubó en hielo por 30 minutos, y posteriormente se les dio un choque térmico a 42 °C por 45 minutos, y finalmente las células

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

se incubaron en hielo por 2 minutos. A cada tubo se le agregó 900  $\mu$ l de medio SOC (medio Luria, glucosa 20 mM y  $MgCl_2$ ) precalentado a 37 °C y se incubó a 37 °C en agitación por 4 hrs. Se estriaron 100  $\mu$ l de células a una dilución 1:10 y 1:100 en cajas petri preparadas con medio Terrific, suplementado con antibióticos [kanamicina (50  $\mu$ g/ml), gentamicina (7  $\mu$ g/ml), tetraciclina (10  $\mu$ g/ml)], con IPTG 0.1 mM y X-Gal (133  $\mu$ g/ml).

### **Preparación del Bácido**

Las colonias blancas obtenidas en el paso anterior se inocularon en 5 ml de Terrific con antibióticos, y se incubaron a 37 °C por 12 hrs. El cultivo en suspensión se centrifugó a 14000 rpm por 30 segundos y se decantó el sobrenadante, la pastilla se resuspendió por vortex en 300  $\mu$ l de la Solución I (15 mM Tris pH 8.0, 10 mM EDTA, RNasa A 100 mg/ml). A la mezcla se le adicionaron 300  $\mu$ l de la solución II (0,2 N NaOH; 1 % de SDS), y se incubó a temperatura ambiente (TA) por 5 minutos. Al término de este tiempo se adicionaron 300  $\mu$ l de la solución III (3 M KAc pH 5.5), y se incubó en hielo por 5 minutos. La mezcla se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo con 800  $\mu$ l de isopropanol y se incubó en hielo por 5 minutos. La mezcla nuevamente se centrifugó a 14000 rpm por 15 minutos, se decantó el sobrenadante y la pastilla se lavó con etanol al 70 %. La pastilla se dejó secar por 10 minutos a TA y se resuspendió en 40  $\mu$ l de TE.

## **Transfección del Bámido a células Sf9**

### **Preparación del complejo celfectina:DNA**

Se mezclaron 9  $\mu\text{l}$  de celfectina (GIBCO, 1 mg/ml) en 150  $\mu\text{l}$  de medio Sf 900II, se incubaron en un tubo de polietileno por 30 minutos a TA; en otro tubo, se mezclaron 6  $\mu\text{l}$  del bámido en 150  $\mu\text{l}$  de medio Sf 900II. Se mezclaron ambos tubos, incubando la mezcla a TA por 20 minutos, se le adicionaron 1.2 ml de medio Sf 900II, y finalmente se le añadió a las células previamente lavadas.

Se sembraron  $2 \times 10^6$  células Sf9 en un F25 con 3 ml de Sf 900, después de dejarlas adherirse al frasco por un periodo de incubación de 1 hr a 27 °C se retiró el medio y las células se lavaron dos veces con medio Sf 900II. Posteriormente, se les adicionó el complejo celfectina:DNA y se incubaron a 27 °C por 5 hrs, al término de este tiempo se les retiró la mezcla de celfectina y se les añadió 5 ml de medio Sf900II. Las células se incubaron por 4 días a 27 °C; posteriormente se recuperó el medio, se centrifugó por 3 minutos a 1000 rpm para retirar detritos celulares y el sobrenadante se guardó a 4 °C. Con el objetivo de aumentar el título viral, se sembraron  $2 \times 10^6$  células Sf9 en un F25 como se describió anteriormente, a estas células se les agregó 1 ml del sobrenadante producto de la primera transfección, se incubaron a 27 °C por 1 hr, se le añadió 4 ml de medio Sf 900II y se dejaron en un periodo adicional de 4 días de incubación a 27 °C. Finalmente este primer "pase" de virus se guardó a 4 °C.

### **Ensayo de expresión de la glicoproteína VP7 de Wa**

Se sembraron  $4 \times 10^5$  células por pozo en cajas de 24 pozos, las células se dejaron adherir a 27 °C por 1 hr, se retiró el medio y se infectaron 8 pozos con 100  $\mu\text{l}$  del

baculovirus obtenido del primer pase. El baculovirus se adsorbió por 4 hrs a 27 °C y posteriormente, se retiró el lisado viral y se agregó 400 µl de medio Sf900II.

El sobrenadante y las células se cosecharon a las 24, 48, 72 y 96 hrs post-infección. Las células se lisaron con 50 µl de amortiguador de carga para geles (50 mM tris-Cl pH 6.8 %, 2 % SDS, 0.1 % de azul de bromofenol, 10 % glicerol, 1 % β-mercaptoetanol), se hirvieron por 5 minutos y se analizaron las proteínas por Western Blot.

## **Western Blot**

### **A) Electroforesis**

Se analizaron 10 µl de cada lisado en un gel de SDS-poliacrilamida al 10 % en amortiguador Tris-Glicina. Las muestras se corrieron a 100 Volts en el gel concentrador (2 ml de H<sub>2</sub>O destilada, 108 µl Tris 2 M pH 6.8, 330 µl de acrilamida-bis (30-0.8 %), 25 µl de SDS 10 %, 25 µl de persulfato de amonio 10 %, 3 µl de Temed) y a 150 Volts en el gel separador (1.9 ml de H<sub>2</sub>O destilada, 720 µl de Tris 2M pH 8.8, 1.33 ml de acrilamida-bis (30-0.8 %), 36.5 µl de SDS 10 %, 25 µl de Persulfato de amonio 10 %, 4 µl de Temed).

### **B) Electrotransferencia, e inmunotinción**

El gel de proteínas (ver arriba) se transfirió a una membrana de nitrocelulosa, a 50 Volts durante 1 hr en amortiguador CAPS (10 mM -ciclohexilamino-1-ácido propanesulfónico- pH 11, 10 % metanol). Para verificar la transferencia, la membrana de nitrocelulosa se tiñó con rojo de Ponceau S (0.1 % Ponceau, en 5 % de ácido acético), se lavó varias veces hasta que se destiñó y se bloqueó con leche descremada en polvo al 5 % en PBS ( por 1 hr en agitación a TA), posteriormente se incubó por 1 hr en agitación a TA con el primer anticuerpo αYM (anticuerpo policlonal de conejo contra el rotavirus porcino de la

cepa YM), diluido 1:1000 en 1 % de leche en PBS. La membrana se lavó tres veces por 10 minutos con PBS- Tween 0.1 % y se incubó con el segundo anticuerpo, anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa (Kikegaard & Perry Laboratories Inc. KPL) usando una dilución 1:3000 en 1 % de leche en PBS por 1 hr a 37 °C. Finalmente, la membrana se lavó tres veces por 10 minutos con PBS-Tween 0.1 % y la detección de las proteínas se realizó con el sustrato luminol (Perkin Elmer), siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **Ensayos de transcripción y traducción *in vitro***

Para estos ensayos, el gen que codifica para VP7 de RRV, clonado en el vector pGEM-3Z, se utilizó como templado para la síntesis de RNAm utilizando el MEGAscript T7 High Yield Transcription Kit (Ambion). El plásmido pGEM-3Z-VP7RRV se linearizó con la enzima *BamH* I (50U/μl, Biolabs), lo cual permite que sólo se transcriba el gen a partir del sitio de inicio de transcripción para la T7 RNA polimerasa (ver figura 8). Después de la digestión el plásmido se trató con 0.25 μg de proteínaasa K, 0.0125M de EDTA y SDS 0.5%, a 37°C por 30' para eliminar toda la proteína contaminante. Al término de este periodo se extrajo el plásmido con fenol/cloroformo y se precipitó con AcONa 3M y etanol. El plásmido linearizado se resuspendió en 10μl de H<sub>2</sub>O y se calculó la concentración por gel de agarosa al 0.8% (TAE), junto a concentraciones conocidas del marcador de peso molecular λ*Hind* III (Promega). Se utilizaron 3μl de este DNA más la mezcla de (0.5 μl de la T7 RNA polimerasa, 0.5 μl de DTT 0.1M, 0.5 μl de RNasin, 1 μl de análogo de CAP 10 mM, 2 μl de NTP's 5 mM y 1 μl de amortiguador 10 x de transcripción). La reacción de la T7 RNA polimerasa se incubó por 1 hr a 37 °C y los RNAm resultantes se observaron en geles de agarosa para verificar su tamaño e integridad y además fueron traducidos utilizando

lisados de reticulocitos de conejo (Gibco), en presencia de [<sup>35</sup>S] metionina (Gibco). La reacción de traducción se incubó por 1 hr a 30 °C y la proteína resultante se analizó en un gel de SDS-poliacrilamida al 10 % como se describió anteriormente.

#### **Diseño de los siRNAs de VP7 de RRV**

Se diseñaron tres siRNAs siguiendo las recomendaciones de Elbashir *et. al.* (16) y de la compañía Dharmacon Research Inc (Lafayette, Co., EUA).

Los siRNAs se diseñan como 21-meros de RNAdc, de 19 nucleótidos (nt) y un dímero de timidina o uridina sobresalientes en el extremos 3' terminal. Los dos nucleótidos son desoxitimidinas (dT<sub>s</sub>) o desoxiuridinas (dU<sub>s</sub>), los cuales aumentan la estabilidad a la degradación por RNasas.

1. La región blanco del gen de donde se diseñan los siRNAs debe estar, preferencialmente, de 50 a 100 nt río abajo del codón de inicio.
2. En esta región se buscan dímeros de As para obtener secuencias del tipo 5'-AA(N<sub>19</sub>), donde N es cualquier nucleótido y donde esta secuencia representa el antisentido al RNAm.
3. Se cuenta el porcentaje de GC de las secuencias y se escogen las que sean mayores que 30 y menores de 70 %.
4. A estas secuencias se les realiza un BLAST contra el GENE BANK y se escogen aquellas que presenten 100 % de homología con el gen de interés, eliminando también las que tengan homología con otros genes ya sea celulares o virales.

Los siRNAs que se diseñaron fueron los siguientes:



8 nt del templado de DNA). Después de que los extremos 3' terminales del iniciador y del templado de DNA han hibridado, se rellenan los extremos con el fragmento Klenow de la enzima DNA polimerasa, para crear los templados para la transcripción de los siRNA's de doble cadena. Posteriormente estos templados se transcriben por la T7 RNA polimerasa y los transcritos de RNA resultantes se hibridan para generar RNA's de doble cadena, éstos contienen en su secuencia; 8 nt líder en los extremos 5' terminales seguido de 19 nucleótidos (blanco específico) y dos Us en los extremos 3' terminales. Las secuencias líder se remueven por digestión del RNAdc con una endoribonucleasa que sólo digiere RNA de cadena sencilla. Los extremos 3' sobresalientes permanecen ya que esta RNasa no digiere residuos de Us. Los siRNAs son purificados por unión a filtros de fibra de vidrio y elusión que remueve excesos de nucleótidos, oligómeros pequeños, proteínas y sales. El producto final es un siRNA de doble cadena de 21 pb con dímeros sobresalientes de uridina en los extremos 3' terminales.

La síntesis química de los siRNAs de VP7-3 y VP7-5 la realizó la compañía Ambion y se recibieron como RNA de cadena sencilla; la formación del dúplex de RNA se realizó siguiendo las recomendaciones del proveedor.

El siRNA de Hsc70 (UUGGTTTCGGTTTCCCTGUTCU -sentido y UUTGUTCUGGGUUCCGUUCC -antisentido) se usó como control y lo denominamos en este trabajo como siRNA<sup>control</sup>. El siRNA fue obtenido como RNA de doble cadena, sintetizados por la compañía Dharmacon Research (Lafayette, CO).

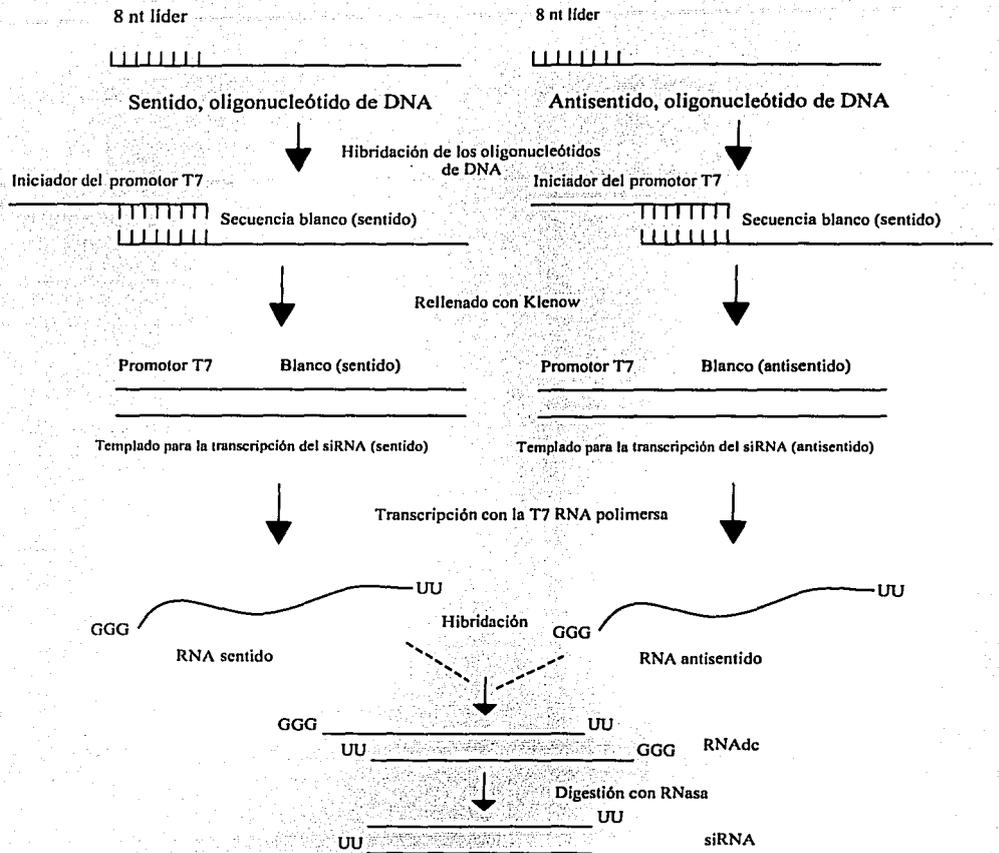


Figura 9. Construcción de siRNAs utilizando el *Silencer* siRNA Construction Kit (Ambion).

### Obtención de siRNA's mediante digestión con la RNasa III o Dicer.

Con el objetivo de generar d-siRNAs y esiRNAs por medio de Dicer y de la RNasa tipo III de *E. coli*, primero se realizó la síntesis de RNAdc, siguiendo el siguiente protocolo.

#### a) Preparación de los templates para síntesis de RNA.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Se linearizaron 2µg del pGEM-3Z-644VP7 (este vector presenta el gen de VP7 de RRV con aproximadamente 500 pb eliminados del extremo 3' terminal) por separado con *Hind* III (10u/µl, Fermentas) y con *Eco*R I (10u/µl, Fermentas), ambas enzimas dejan extremos 5' sobresalientes, el sitio de corte para estas enzimas se encuentra *rio abajo y rio arriba* del sitio *Sma* I, respectivamente, donde fue clonado el gen, Esto permite que sólo se transcriba el gen a partir del sitio de inicio de transcripción para la T7 RNA polimerasa o para la SP6 RNA polimerasa, respectivamente (ver figura 8). Después de la digestión los plásmidos se trataron con 0.25 µg de proteinasa K, 0.0125M de EDTA y SDS 0.5%, a 37°C por 30' para eliminar toda la proteína contaminante, al término de este periodo se extrajo el DNA de plásmido con fenol/cloroformo y se precipitó con AcONa 3M y etanol. Los plásmidos linearizados se resuspendieron en 10µl de H<sub>2</sub>O y se calculó la concentración por gel de agarosa al 0.8% (TAE), junto a concentraciones conocidas del marcador de peso molecular λ*Hind* III (Promega).

#### **b) Síntesis *in vitro* de RNAs y generación de RNAdc**

La síntesis *in vitro* de las RNAs a partir de los dos plásmidos linearizados se realizó utilizando las RNA polimerasas T7 o SP6 del MEGAscript High Yield Transcription Kit (Ambion), siguiendo las instrucciones del estuche. La reacción de transcripción se incubó por 4 hrs a 37°C, al término de este periodo se trató con 1µl de DNasa por 15' a 37°C para eliminar el templado, las reacciones se mezclaron y se hirvió la mezcla por 3' a 90 °C, se mantuvo en hielo por 5' y se dejó por 12 hrs en un baño a 65 °C. El RNAdc se observó en un gel de agarosa al 2% (TAE). El RNAdc se precipitó con LiCl y resuspendió en 40 µl de

H<sub>2</sub>O libre de RNAsas, se cuantificó en el espectro a una absorbancia de 260 (1 OD=40 µg/ml) y se guardó a - 70 °C.

### **c) Digestión del RNAdc con Dicer**

El RNAdc obtenido en el paso anterior, se digirió con la enzima Dicer siguiendo las instrucciones del manual de Dicer siRNA Generation Kit (Gene Therapy Systems GTS), la reacción de digestión se incubó por 12hrs a 37°C, los siRNAs así obtenidos (d-siRNAs) de ~22pb se observaron en un gel de agarosa al 3% (TAE). Los d-siRNAs se purificaron en minicolumnas para remover las sales y los nucleótidos no incorporados, siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente la concentración de los d-siRNAs purificados se cuantificó en el espectro a una absorbancia de 260 (1 OD=40 µg/ml), se observaron en un gel de agarosa al 3% (TAE ) y se guardaron a -20°C.

### **Digestión del RNAdc con RNasa tipo III de *E. coli***

20 µg de RNAdc se digirieron con la de enzima RNasa tipo III (1U/µg de RNAdc, Ambion), la reacción se incubó por 15' a 37°C, al término de este periodo la enzima se inactivó con EDTA 100 mM en hielo. Los siRNAs así obtenidos (esiRNAs) se observaron en un gel de agarosa al 3% (TAE). A la mezcla de esiRNAs se les agregaron 5 volúmenes de solución PN (QIAquick Nucleotide Removal Kit, Quiagen). La mezcla se agregó a la columna QIAquick spin y se centrifugó a 6000 rpm por 1', esta columna deja pasar oligonucleótidos entre 15 y 25 pb, y retiene oligonucleótidos mayores a 25 pb. El eluido de la columna se precipitó con Etanol y NH<sub>4</sub>OAc 5M, los esiRNAs fueron resuspendidos en 10 µl de H<sub>2</sub>O libre de RNAsas. Finalmente la concentración de los esiRNAs purificados se

cuantificó en el espectro a una absorbancia de 260 ( $1\text{ OD}=40\ \mu\text{g/ml}$ ), se observaron en un gel de agarosa al 3% (TAE) y se guardaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **Lipofección de los siRNAs**

Las células MA104 se crecieron en monocapas a confluencia en MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino. Las células fueron transfectadas usando una mezcla que contiene:  $4\ \mu\text{l}$  de lipofectamina (Invitrogen) por cada  $6\ \mu\text{l}$  de siRNAs  $20\ \mu\text{M}$  en  $50\ \mu\text{l}$  de MEM, esta mezcla se incubó a TA por 25 minutos, tiempo requerido para la formación del complejo. Al término de este tiempo se le añadió a la mezcla  $150\ \mu\text{l}$  de MEM, y la mezcla se agregó a las células previamente lavadas con MEM. Las células se incubaron por 8 hrs a  $37^{\circ}\text{C}$ , y posteriormente las células se lavaron dos veces con MEM, y se mantuvieron en este medio a  $37^{\circ}\text{C}$  por 36 hrs, tiempo al cual fueron infectadas. Para los ensayos de interferencia con los esiRNAs y con los d-siRNAs, las células fueron infectadas, antes de ser transfectadas (como se describe más abajo), la mezcla de transfección se dejó durante 10 hrs post-infección a  $37^{\circ}\text{C}$ , tiempo al que las células y el sobrenadante fueron cosechados.

### **Ensayo de titulación para medir el rendimiento viral.**

Monocapas de células MA104 confluentes sembradas en placas de 24 pozos se infectaron a una multiplicidad de 3 virus/célula, el virus se dejó adsorber por una hora a  $37^{\circ}\text{C}$ , se retiró el inóculo viral, se le añadió MEM sin suero y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  por 12 hrs, tiempo al cual las células fueron congeladas y descongeladas dos veces. Parte del lisado viral se analizó por western blot y la otra parte del lisado se incubó con tripsina  $10\ \mu\text{g/ml}$  por 30 min a  $37^{\circ}\text{C}$ , para activar al virus. Se utilizaron diluciones seriales de este lisado para infectar monocapas de células MA104 sembradas en placas de cultivo de 96 pozos, como se

describió anteriormente. Las células infectadas se incubaron por 14 hrs a 37 °C, se retiró el medio y se fijaron con acetona al 80 % en PBS por 30 min a TA; posteriormente se lavaron dos veces con PBS y se les añadió 50 µl por pozo de anticuerpo policlonal anti rotavirus ( $\alpha$ YM), a una dilución 1:1500, y se incubaron por 1hr a 37 °C; se retiró el anticuerpo y se lavó dos veces con PBS. Las células se incubaron con 50 µl por pozo de una dilución 1:2000 de proteína A acoplada a peroxidasa (Kierkegard & Perry) por 1 hr a 37 °C, se lavaron dos veces y se agregó 50 µl por pozo del 3-amino-9-etil- carbazole (Sigma) (substrato para la peroxidasa que produce un precipitado de color café que se deposita sobre las células positivas para el anticuerpo viral). La determinación del título viral se obtuvo contando las células teñidas en cada dilución por medio de la unidad Visiolab 1000 station (Biocom) como se describe en Guerrero, *et al* (23).

### **Inmunofluorescencia**

Monocapas de células MA104, crecidas sobre cubreobjetos de 10 mm de diámetro, se infectaron como se describió anteriormente; 8 hrs post infección, las células fueron fijadas con paraformaldehído (Sigma) al 2 % en PBS por 20 min y permeabilizadas con 0.5 % de Tritón X-100 (Sigma), 1 % de BSA (Sigma) en PBS por 15 min a TA; se lavaron 4 veces por 5 min con 50 mM NH<sub>4</sub>Cl en PBS y se incubaron por 1 hr a TA con una mezcla de los anticuerpos mAb 60 dirigido contra VP7 y suero de conejo anti-NSP5 (C6), al término de esta incubación las células se lavaron 4 veces por 5 min con 50 mM NH<sub>4</sub>Cl en PBS, posteriormente se incubaron con una mezcla de los anticuerpos anti-conejo IgG acoplado a Alexa 568 y el anti-ratón IgG acoplado con Alexa 488 (Molecular Probes) por 1 hr a TA, se lavaron 4 veces por 5 min con NH<sub>4</sub>Cl 50 mM en PBS, y se montaron en portaobjetos de 76 por 26 mm. Finalmente, las células se observaron en un microscopio de epifluorescencia

(Eclipse E600, Nikon), y las imágenes se procesaron utilizando el programa ACT-1 versión 2.11.

### **Gradientes de CsCl**

Se crecieron células MA104 a confluencia en frascos de 75 cm<sup>2</sup>, las cuales fueron transfectadas con los siRNAs descritos anteriormente, 48 hrs después fueron infectadas con la cepa de rotavirus RRV a una multiplicidad de 3 virus/célula, el virus se dejó absorber por una hora a 37 °C; se retiró el inóculo viral, se le añadió MEM sin suero y se incubó a 37 °C hasta observar efecto citopático completo, tiempo al cual las células fueron congeladas.

El lisado viral obtenido a partir de esta infección fue congelado y descongelado dos veces, y centrifugado a 4°C por 1 hr a 30000 rpm en el rotor SW50.1 (Bekman), una vez precipitado el lisado, se decantó el sobrenadante, y la pastilla se resuspendió en TNC (10 mM Tris pH 7.5, 140 mM NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>), la mezcla se extrajo varias veces con freón hasta que la fase del solvente quedó transparente. A la fase acuosa resultante se le añadió 2.2 gr de CsCl para 5 ml de TNC (aproximadamente a una  $\delta=1.362$ ) y se centrifugó durante 18 hrs a 36,000 rpm en el SW50.1 a 4 °C, finalmente se colectaron las bandas opalescentes por punción y se guardaron en CsCl a 4 °C. El virus se desaló pasándolo a través de resina Sephadex G-25 en PBS estéril. El contenido de proteínas de cada banda se analizó por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida al 10 % .

## RESULTADOS y DISCUSIÓN

Con el objetivo de sobreexpresar la glicoproteína VP7 de rotavirus de la cepa de humano Wa, para estudiar de manera *in vitro* las regiones de la proteína que están involucradas en la interacción con receptores celulares, se siguió la siguiente estrategia experimental para construir un baculovirus recombinante que expresará esta proteína glicosilada en células de insecto.

### Construcción del vector de transferencia pFastBac1-VP7Wa

Para construir el vector pFastBac1-VP7Wa, el cDNA de VP7 de Wa obtenido a partir del RT-PCR se digirió con la enzima de restricción *Sma* I debido a que los oligonucleótidos utilizados, YM9-3' y YM9-5' (ver materiales y métodos), dejan sitios *Sma* I en los extremos 5' y 3' del producto amplificado. Por otro lado el pFastBac1 se digirió con *Stu*I.

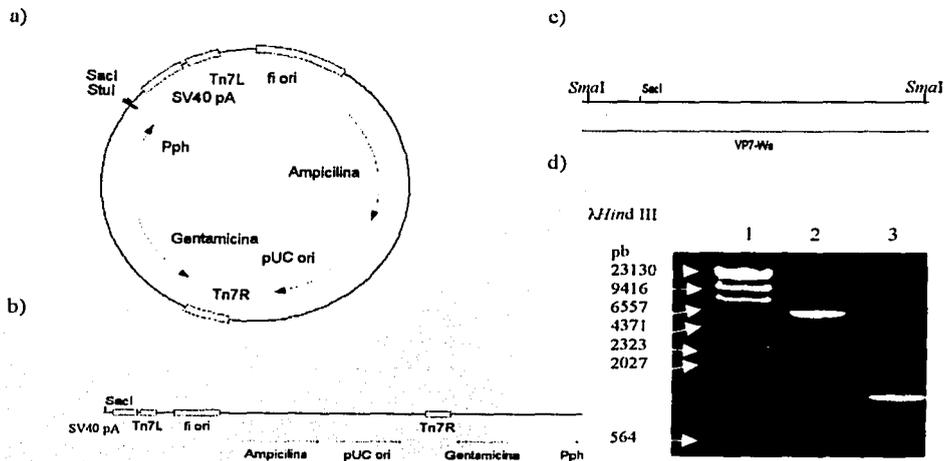


Figura. 10. Construcción del vector de transferencia pFastBac1-VP7Wa. a) Vector pFastBac1, se muestran los sitios de *Stu* I (sitio 4071) y *Sac* I (sitio 4081); b) Esquema que representa el pFastBac1 después de ser digerido con la enzima de restricción *Stu* I. c) Esquema que representa el cDNA de VP7 de Wa con los sitios *Sma* I, los cuales fueron digeridos para su clonación en pFastBac1- *Stu* I; d) Comparación de las digestiones. Gel de agarosa 1.2 %. 1) *Hind* III; 2) pFastBac1-*Stu*I; 3) RT-PCR de VP7/*Sma* I.

En la figura 10 se muestran el vector pFastBac1 linealizado con *Sma*I y el fragmento del PCR digerido con *Sma*I. A partir de este gel se calculó la concentración de DNA tanto del vector como del inserto para la reacción de ligación.

El plásmido resultante se electroporó en células DH5 $\alpha$  y se analizó el DNA de 15 colonias resistentes a ampicilina. De éstas, se seleccionaron dos clonas cuyos plásmidos eran de mayor tamaño con respecto al del plásmido pFastBac1. Los plásmidos se analizaron por digestión con *Sac*I para verificar la orientación del gen. El producto esperado de la ligación de pFastBac1 con el gen de VP7 tiene dos sitios para *Sac*I (sitio 4081 en pFastBac1 y sitio 194 para VP7). Como se muestra en la figura 11, la digestión del plásmido (de la clona 2) con esta enzima generó los dos fragmentos esperados (de 868 pb y de 4949 pb), por lo que se concluyó que el gen de VP7 está en la dirección correcta 5'-3' con respecto al promotor de polihedrina (Pph).

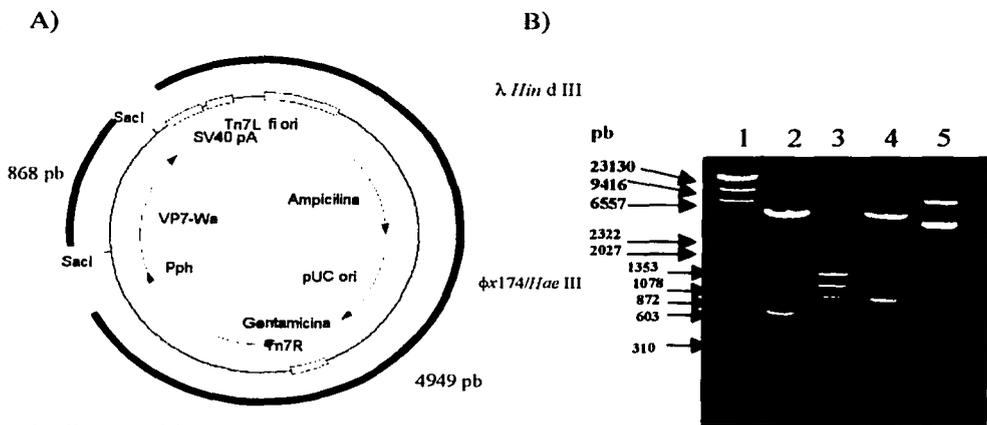


Fig. 11. Esquema del vector de transferencia pFastBac1-VP7Wa. A) En este esquema se muestra los sitios donde digiere la enzima *Sac*I que se utilizó para seleccionar el vector de transferencia. El pFastBac1 presenta el sitio para *Sac*I en el nucleótido 4081 y VP7 en el nucleótido 194. También se muestran los fragmentos esperados (líneas negras) que son: 868 pb y 4949 pb B) Gel de agarosa 1.2 %. 1),  $\lambda$ Hind III; 2) clona 1 digerida con *Sac*I; 3)  $\phi$ x174IIIae III; 4) clona 2 digerida con *Sac*I; 5) DNA de la clona 2 sin digerir.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

El inserto contenido en este plásmido (llamado pFastBac1-VP7Wa) se secuenció. Dicha secuencia se comparó con otras dos secuencias obtenidas del Gene Bank (números de acceso K02033 y M21843) para verificar la identidad del gen. El análisis de las secuencias mostró que el gen de VP7 codifica para un marco abierto de lectura de 326 aminoácidos, y presentó tres cambios en la secuencia de aminoácidos con respecto a las otras dos secuencias reportadas: de ác. aspártico a valina en la posición 97 (D97V), de glutámico a glutamina en la posición 220 (E220Q) y de serina a prolina en la posición 266 (S266P). Cada uno de estos cambios en la secuencia de aminoácidos se localizan dentro de zonas no conservadas y no en las zonas conservadas, las cuales fueron encontradas a partir de una comparación entre las secuencias de aminoácidos de la proteína VP7 de cepas de rotavirus de los 14 serotipos G diferentes (33).

#### **Obtención del Baculovirus recombinante.**

Para construir baculovirus recombinantes existen varios sistemas. El que se empleó en este trabajo se denomina Bac to Bac (ver figura 12) -desarrollado por la compañía Invitrogen-, el cual se basa en la transposición sitio específica de un cassette de expresión dentro de un bácmido propagado en *E. coli*. El bácmido (bMON14272) es un plásmido de bajo número de copias del replicón mini-F que contiene un marcador de resistencia a kanamicina y un segmento de DNA que codifica para el péptido *lacZ $\alpha$*  de pUC. En el amino terminal del gen de *lacZ $\alpha$*  se encuentra insertado un pequeño segmento que contiene el sitio de unión para el transposón bacteriano Tn7 (mini-*att*Tn7) que no cambia el marco de lectura del péptido *lacZ $\alpha$* . Este plásmido contiene, además, todo el genoma del baculovirus.

El b́acmido se propagó en *E. coli* en la cepa DH10Bac como un gran pĺasmido que confiere resistencia a kanamicina. Este b́acmido complementa además una deleción en *lacZ*, presente en el cromosoma bacteriano, permitiendo la formación de colonias azules (*Lac*<sup>+</sup>) en presencia del sustrato X-gal y el inductor IPTG (47, 76).

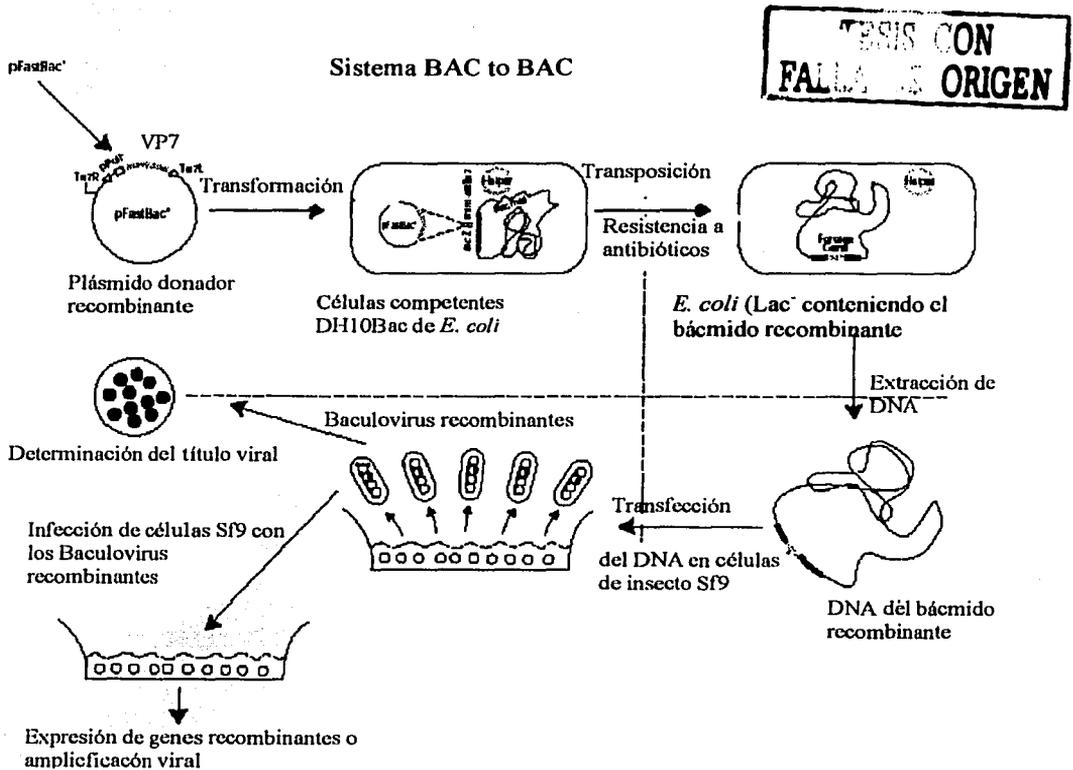


Figura 12. Generación de baculovirus recombinantes y expresión del gen con el sistema de expresión BAC-TO-BAC.

Los b́acmidos recombinantes se construyeron al transformar el pĺasmido de transferencia pFastBac1-VP7Wa a las células DH10Bac. Dentro de estas células se da una transposición del elemento mini-Tn7 del pĺasmido pFastBac1-VP7Wa al sitio de unión del

mini-*att*Tn7 dentro del b́acmido. El pĺasmido helper (pMON7124), que se encuentra en la cepa DH10Bac, provee en *trans* las funciones de transposici3n del Tn7 y confiere resistencia a tetraciclina. El mini-Tn7 en pFastBac1 presenta un cassette de expresi3n que consta de un gen de resistencia a gentamicina (Gm<sup>r</sup>), un promotor de polihedrina de AcNPV seguido de un sitio mltiple de clonaci3n y una se1al de poli(A) de SV40 insertada entre los brazos derecho e izquierdo del Tn7 (ver figura 1 materiales y m3todos). La inserci3n del mini-Tn7 se da en el sitio de uni3n del mini-*att*Tn7 del b́acmido, interrumpiendo as3 el marco abierto de lectura del p3ptido *lacZ* $\alpha$ , por lo que las colonias que contienen el b́acmido recombinante son blancas (47, 76).

Al transformar el vector de transferencia pFastBac1-VP7Wa en las c3lulas DH10bac, se obtuvieron colonias blancas, en donde se dio la transposici3n sitio espec3fica. El DNA de los b́acmidos recombinantes de estas colonias blancas se aisl3 de peque1os cultivos. En la figura 4 se muestra el DNA de 5 b́acmidos recombinantes donde se puede observar el b́acmido, el pFastBac1 y el pĺasmido helper. Los b́acmidos de estas colonias se usaron para

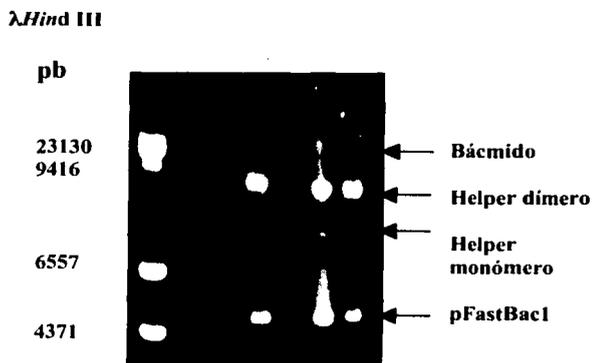


Fig. 13. Gel de agarosa al 0.5 %. 1)  $\lambda$ Hind III, 2-5) b́acmidos 1-4 respectivamente; 6) b́acmido control.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

transfectar células de insecto Sf9, donde se pueden replicar como baculovirus. Con los baculovirus recombinantes, obtenidos de la transfección, se infectaron más células de insecto para expresar la proteína recombinante y para aumentar el título viral.

Para determinar si los baculovirus recombinantes son capaces de dirigir la expresión de VP7, se hicieron ensayos de inmunotinción con peroxidasa utilizando anticuerpos específicos (C11 o  $\alpha$ YM) contra dicha proteína. En estos ensayos, sin embargo, se encontró una alta reactividad inespecífica que impidió distinguir entre las células que expresaban o no VP7. En base a estos resultados se decidió trabajar con el baculovirus: que presentó el mayor título viral; es decir, aquel que dio el mayor número de células con efecto citopático.

Para identificar el tiempo de mayor expresión de la proteína recombinante se realizó el siguiente experimento: células Sf9 en cajas de 48 pozos se infectaron con el baculovirus y se cosecharon a distintos tiempos post-infección (p.i.): 24, 48, 72, y 96 hrs p.i.; se recuperó el medio de cultivo y se obtuvieron las células lisadas con solución de lisis.

Para determinar la presencia de la proteína VP7 en ambas fracciones (medio y células) se realizó un ensayo de western blot. Utilizando un anticuerpo policlonal que reconoce a VP7.

En la figura 14 se muestra que la mayor expresión de la proteína, señalada como banda 3, se observa a las 72 hrs p.i. Después



Fig. 14. Ensayo de expresión de la proteína VP7 (anticuerpo policlonal,  $\alpha$ YM). Gel de SDS-poliacrilamida 10 %. 1) RRV; 2) 24 hrs p.i.; 3) 48 hrs p.i.; 4), 72 hrs p.i.; 5-6) 96 hrs p.i.; 7) Lisado celular sin infectar.

TIPO CON  
FALLA DE ORIGEN

de este tiempo la proteína empieza a desaparecer muy probablemente por degradación. Estas observaciones se realizaron con los lisados de las células infectadas, pero también se colectó el sobrenadante de la infección a los mismos tiempos con el objetivo de identificar si la proteína se estaba secretando al medio de cultivo. No se encontró la proteína en el medio a ningún tiempo post infección (datos no mostrados), por lo que se concluyó que no fue secretada. También en la figura 14 se observa que la proteína que pudiera ser VP7 que expresa el baculovirus (banda 3) presenta un peso molecular menor con respecto a la proteína VP7 de la cepa de simio RRV (marcada con una flecha (→), con un peso molecular de 37 kDa). Sin embargo, para poder confirmar que la proteína de la banda 3 es la proteína VP7 de Wa, es necesario repetir este experimento utilizando un control de células Sf9 infectadas con un baculovirus silvestre, esto con el objetivo de descartar la posibilidad de que esta proteína sea una proteína del baculovirus que reaccionó con el anticuerpo que usamos, además, también es necesario hacer la comparación con un lisado del virus Wa para ver si la migración cambia con respecto al virus RRV. En trabajos anteriores se han comparado los pesos moleculares de la proteína VP7 de las cepas Wa, SA11, y BDV (de bovino), por migración en geles de poliacrilamida, y lo que se ha visto es que los pesos no varían mucho, por lo que es de esperarse que la migración de Wa y de RRV sea de manera similar. También en este trabajo se trató a la proteína de las diferentes cepas con la enzima endoglicosidasa H (usada para evaluar la presencia de azúcares de alta manosa en la proteínas) y lo que se observó es que la proteína VP7 de SA11 tuvo una reducción en el peso molecular de 2.5 kDa. Dicha proteína presenta un solo sitio potencial de glicosilación en el aminoácido 69 (31), en cambio la proteína VP7 de Wa tuvo una reducción en el peso molecular de 5 kDa, lo que indica que la proteína está glicosilada en dos, de sus tres sitios potenciales de glicosilación (10, 35). Tomando en cuenta estos antecedentes podemos decir que la proteína de la banda 3

probablemente sea la VP7 de Wa y que al parecer no está siendo glicosilada en la línea celular Sf9.

Esta línea celular presenta la característica de glicosilar proteínas con oligosacáridos del tipo de alta manosa (N-glicosilación) (47). La proteína VP7 de Wa como ya se mencionó presenta en su secuencia de aminoácidos tres sitios potenciales de glicosilación: Tirosina-X-Asparagina (YXN, donde X puede ser cualquier aminoácido) en los aminoácidos 67-69, 121-123, 302-304 (17), estos tres sitios se encuentran conservados en la proteína VP7 de Wa que se secuenció. Los oligosacáridos que presenta la proteína VP7, en las partículas virales maduras, son oligosacáridos de alta manosa. Por ejemplo, el oligosacárido  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  se encuentra en la proteína VP7 de las partículas virales maduras de la cepa de rotavirus de simio SA11. En la figura 14 se observa una proteína (banda 1) que reacciona contra el anticuerpo  $\alpha\text{YM}$  en todas las muestras, por lo que se piensa que es una proteína celular; sin embargo, también se observa una tercera proteína (banda 2) que reacciona con el mismo anticuerpo, pero sólo en las muestras del baculovirus de VP7 y no en la muestra de células sin infectar. La proteína de la banda 2 presenta un peso molecular mayor a 46 kDa, y como los oligosacáridos del tipo de alta manosa incrementan en, a lo mucho, 5 kDa el peso molecular de la proteína VP7 (35), se descarta la posibilidad de que sea la VP7 glicosilada. Se piensa por tanto que el anticuerpo  $\alpha\text{YM}$  presenta una reactividad inespecífica contra la proteína (banda 2) y que posiblemente forma parte de las proteínas del baculovirus.

Aunque el objetivo de expresar la VP7 de Wa glicosilada no se cumplió, sería importante tratar de explorar si en otras líneas celulares se puede glicosilar, para sobreexpresarla, purificarla y entonces poder analizar de manera *in vitro* cuáles son las regiones importantes en la proteína que interaccionan con receptores celulares que le

permiten finalmente al virus entrar a la célula e infectar. También el poder expresar la proteína en su forma glicosilada podría ser importante en la generación de anticuerpos, debido a que es la principal inductora de anticuerpos neutralizantes en rotavirus detectada por suero hiperinmune. Además de la glicosilación, la expresión de la proteína VP7 en este sistema (*Baculovirus-recombinante células de insecto*) permite también la coinfección con otros baculovirus recombinantes que expresen las proteínas VP2, VP4, VP6 y VP7 de cepas de rotavirus humanos o de otras cepas de rotavirus. Las coinfecciones con estos baculovirus recombinantes permite la formación de pseudopartículas o VLP's (virus like particles), que se forman de manera espontánea y pueden servir como vacunas potenciales (14). Sería interesante también poder estudiar cómo se da la unión de estas VLP's a receptores celulares. la primera interacción del virus Wa con los receptores celulares -aun no descritos-, parecer ser a través de la glicoproteína VP7; en cambio, en las cepas de rotavirus de origen animal no humano dicha interacción en primera instancia se da con receptores celulares -tampoco caracterizados- que presentan ácidos siálicos, a los cuales se une la proteína VP4 a través de su dominio HA (hemaglutinación).

### **Construcción del vector pGEM-3Z-VP7RRV**

Para construir este vector, el producto del RT-PCR del gen VP7 se digirió con la enzima *Sma* I que corta en los extremos 5' y 3'. Los sitios *Sma* I se insertaron durante el RT-PCR por los oligonucleótidos YM9-5' y YM9-3'. Se usó el vector pGEM-3Z que presenta dos promotores: para la T7 RNA polimerasa y, para la SP6 RNA polimerasa. Ambos promotores flanquean un sitio múltiple de clonación (ver figura 8). El gen de VP7 de la cepa de rotavirus de simio RRV se insertó en este vector para sintetizar RNA de

cadena sencilla a partir de ambos promotores y así obtener RNA de doble cadena por la hibridación del producto de ambas transcripciones.

El plásmido pGEM-3Z se digirió con *Sma* I y se trató con la enzima Fosfatasa Alcalina Intestinal Bovina (CIP) que cataliza la hidrólisis de los residuos 5' fosfato del DNA permitiendo que el plásmido no se religue y se circularice de nuevo.

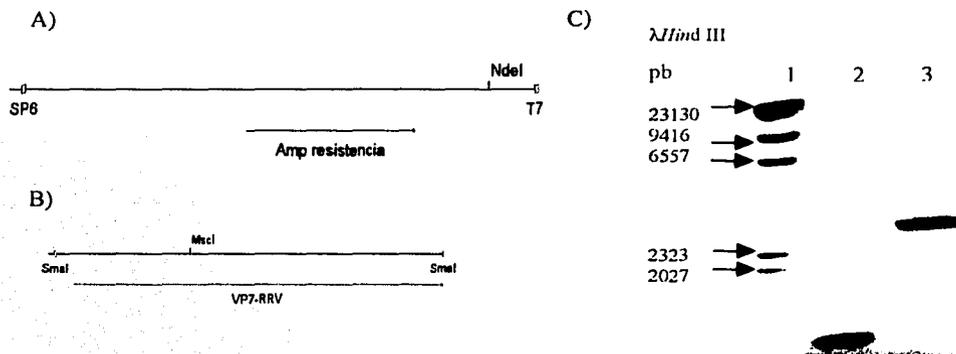


Fig. 15. Construcción del vector pGEM-3Z VP7RRV. A) Se muestra el pGEM-3Z digerido con la enzima *Sma* I, y el sitio *Nde* I (nucleótido 2508). B) Esquema que representa el cDNA de VP7 de RRV con los sitios *Sma* I en los extremos del gen, los cuales fueron digeridos para clonar el gen en pGEM-3Z-*Sma* I. También se muestra el sitio *Msc* I (nucleótido 404) C) Comparación de las digestiones. Gel de agarosa 1.2 %. Línea 1),  $\lambda$ Hind III; 2) RT-PCR de VP7/*Sma* I 3) pGEM-3Z *Sma* I.

En la figura 15 se muestra la comparación de estas dos digestiones a partir de la cual se calculó la concentración de DNA del plásmido y del inserto para la reacción de ligación. El producto de la ligación se electroporó en células JM101 que se plataron en cajas petri con agar y medio luria en presencia de ampicilina. Se analizaron doce clonas que crecieron en presencia de ampicilina y de éstas se seleccionaron siete en base al patrón de la migración de sus plásmidos con respecto a la migración del pGEM-3Z. Estos siete plásmidos se analizaron por digestión con las enzimas de restricción *Nde* I y *Msc* I para determinar cuál de las clonas presentaba el inserto y la orientación del mismo. El producto esperado de la ligación de pGEM-3Z con el gen de VP7 tiene un sitio *Nde*I en pGEM-3Z

(nucleótido 2508) y un sitio *MscI* en VP7 (nucleótido 404). Como se muestra en la figura 16, la digestión de los plásmidos de las clonas 5 y 6 con estas enzimas (líneas 7 y 8 respectivamente) genera los dos fragmentos esperados (660 pb y 3155 pb), por lo que se concluyó que el gen de VP7 está en la dirección 5'-3' (con respecto al promotor T7) en ambos en plásmidos.

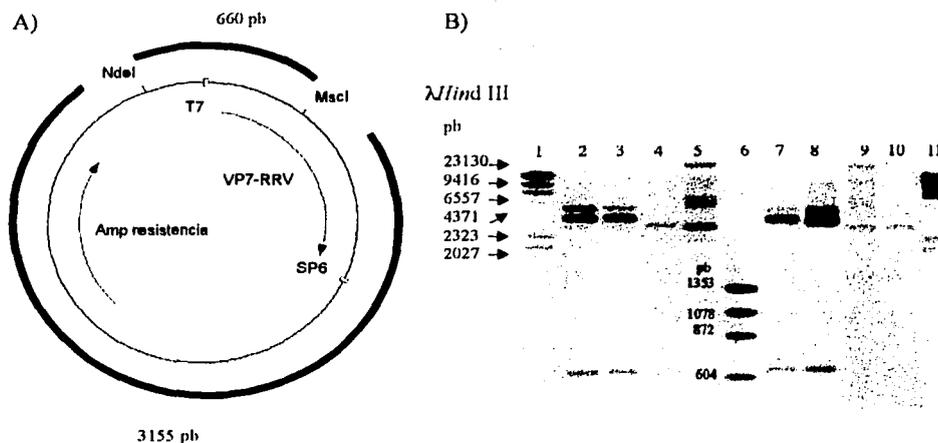


Fig. 16. Esquema del vector pGEM-3Z VP7RRV. A) En este esquema se muestra los sitios donde digiere la enzima *Nde* I (nucleótido 2508 en pGEM-3Z) y el sitio *Msc* I (nucleótido 404 en VP7 RRV) los cuales se utilizaron para seleccionar el vector. También se muestran los fragmentos esperados (líneas negras) que son: 660 pb y 3155 pb. B) Comparación de las digestiones de los plásmidos con las enzimas de restricción *Nde* I y *Msc* I. Gel de agarosa al 0.8 %. Línea 1  $\lambda$ Hind III; 2-5) digestión de los plásmidos de las clonas 1 a 4 respectivamente; 6)  $\phi$ x174/Hae III; 7-9) digestión de los plásmidos de las clonas 5 a 7, respectivamente, 10) digestión de pGEM-3Z; 11)  $\lambda$ Hind III.

Para corroborar la integridad del gen, se realizó un ensayo de transcripción-traducción *in vitro*. Para ello, el plásmido (pGEM-3Z-VP7RRV) se digirió con *Bam* HI, en el nucleótido 26 del sitio múltiple de clonación de pGEM-3Z (ver figura 8). Esta enzima, al linearizar el plásmido, sólo se transcribe el gen a partir del promotor de T7 y provoca que la T7 RNA polimerasa ya no tenga sustrato para seguir sintetizando más RNA y se desensamble el complejo de transcripción, transcribiéndose sólo el gen de interés. En la figura 17 panel A se muestran los RNA's productos de la transcripción que sirvieron de

TRP CON  
FALLA ORIGEN

substrato para realizar los ensayos de traducción *in vitro*. Estos ensayos se realizaron utilizando reticulocitos de conejo. En el panel B de la misma figura se muestra el producto de esta traducción. En él se puede observar que la proteína migra más arriba de 30 kDa, lo que es comparable con el peso molecular reportado de la proteína VP7 sin glicosilar que es de 33 kDa.

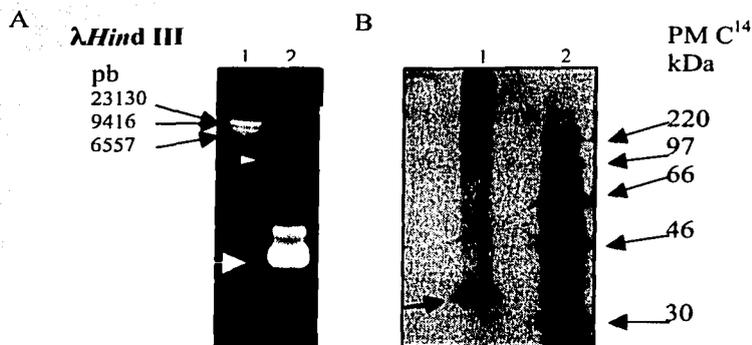


Fig. 17. Ensayo de transcripción- traducción *in vitro*. Panel A. Gel de Agarosa al 1.5 %. Línea 1  $\lambda$ Hind III; 2) producto de la transcripción (▸) y pGEM-3Z VP7RRV digerido con BamH I (▬) Fluorografía de un gel de SDS-poliacrilamida al 10 %, línea 1 producto de la traducción (→), 2) marcador de peso molecular (PM) C<sup>14</sup>.

### Generación de RNAdc del gen VP7 de RRV

Como se mencionó en la introducción, la interferencia de RNA, resulta en el silenciamiento de la expresión de un gen específico. En células de mamífero este silenciamiento se puede obtener al introducir moléculas de siRNA con secuencias complementarias al gen que se desee interferir. En este trabajo exploramos distintas maneras de obtener los siRNA's para estudiar el efecto del silenciamiento de la proteína VP7 sobre el ciclo viral.

Existen varias maneras de obtener los siRNA's *in vitro* entre las que se pueden mencionar la síntesis química de los 21-meros o la síntesis enzimática de los mismos

TRIPS CON  
FALLA DE ORIGEN

utilizando, como templados, oligonucleótidos de DNA. Recientemente se describió que es posible obtener siRNA's a partir de la digestión del RNAdc utilizando ya sea, la RNAsa tipo III de *E. coli* o la enzima recombinante de origen humano Dicer. La RNAsa tipo III de *E. coli* es una endoribonucleasa dependiente de  $Mg^{2+}$  (2) que tiene como sustrato al RNAdc. Éste puede ser digerido en fragmentos cortos de hasta 12 a 15 pb de RNA dúplex (esiRNAs, endoribonuclease-prepared siRNAs) que son incapaces de activar la maquinaria de interferencia en células de mamífero. Sin embargo, para generar esiRNAs más grandes se puede utilizar a la RNAsa tipo III en digestiones parciales de los RNAdc, generando esiRNAs de 20 a 25 nt. Estos esiRNAs presentan la misma estructura que los siRNAs: 5' fosfato/3' hidroxilo terminal con dos o tres nucleótidos sobresalientes en sus extremos 3' terminal. Los esiRNAs pueden ser transfectados en células de mamífero y son capaces de activar la maquinaria de interferencia inhibiendo específicamente la expresión de genes (70). Del mismo modo, se puede generar d-siRNAs *in vitro*, mediante la degradación del RNAdc con la enzima Dicer de Humano, que también activan eficientemente el mecanismo de interferencia (34, 48). En este trabajo probamos varias de estas estrategias para evaluar cuál de ellas era la más efectiva para silenciar el gen de VP7.

La obtención de esiRNAs y d-siRNAs necesitó, en primer lugar, generar RNAdc del gen de VP7 de RRV que sirviera como sustrato de las enzimas RNAsa tipo III y Dicer. Dichas enzimas digieren mejor con sustratos de RNAdc de tamaños iguales o menores de 500pb, por lo que inicialmente se le eliminaron aproximadamente 500 pb del extremo 3' terminal al gen de VP7 insertado en el plásmido pGEM3Z (figura 18 panel A). El pGEM-3Z-VP7RRV fue digerido con la enzima *Hinc* II que corta en los sitios 38 del pGEM-3Z y 994 en VP7 y con la enzima *Bsr*G I que corta en el sitio 644 del gen VP7. Esta digestión

permitted the elimination of nucleotide 644 to 1068. The digested product was religed and electroporated into JM101 cells (fig. 18 panel B). Five ampicillin-resistant clones were analyzed.

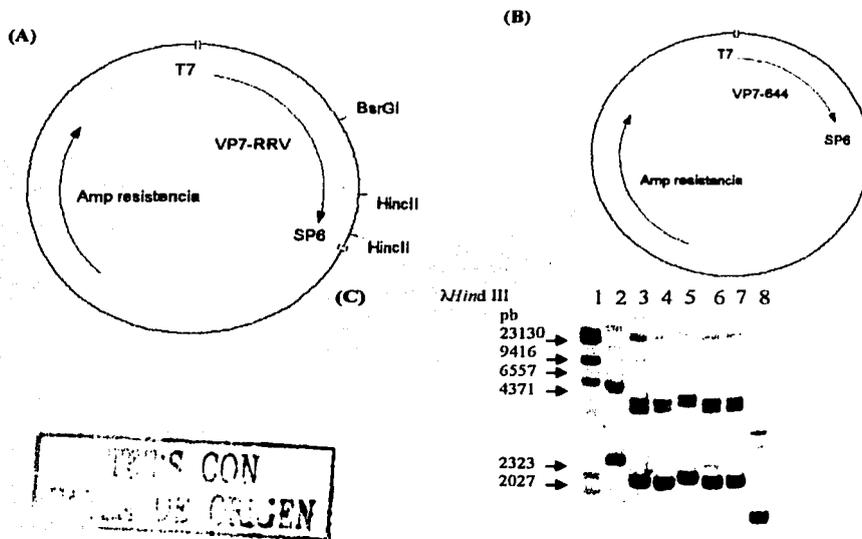


Fig. 18. (A) Esquema del pGEM-3Z VP7RRV, se muestran los sitios *Hinc* II (nucleótido 38 en pGEM-3Z y nucleótido 994 en VP7) y el sitio *Bsr* G I (nucleótido 644 del gen VP7). B) Construcción de pGEM-3Z VP7644. (C) Comparación de los plásmidos obtenidos por la eliminación de ~500pb del extremo 3' terminal del gen VP7 insertado en el plásmido pGEM-3Z. Línea 1  $\lambda$ Hind III, 2) pGEM-3Z-VP7RRV; 3 a 7) plásmidos 1 a 5, respectivamente; 8) pGEM-3Z.

In panel C, it is observed that the plasmids of these five clones migrate lower than the pGEM-3Z-VP7RRV, so it is concluded that in these plasmids, approximately 500 bp (except for the plasmid of clone 3, which migrates a little higher than the other plasmids) were eliminated.

Work was done with one of the plasmids -the one designated pGEM-3ZVP7644- for the synthesis of single-stranded RNA (RNAs) from the SP6 and T7 promoters that flank the gene (see figure 19 panel A).

El RNA de doble cadena se generó por la hibridación de los RNAs. En la figura 19 panel B se observa que el RNAdc migra de manera similar al fragmento de DNA del marcador  $\phi x174/Hae III$ , de 603 pb. Este RNAdc presenta un tamaño aproximado a 600 pb, que le permite ser usado como sustrato para generar los esiRNAs y los d-siRNAs, por medio de la degradación con la RNAsa tipo III de *E. coli* y con la enzima Dicer de origen humano, respectivamente.

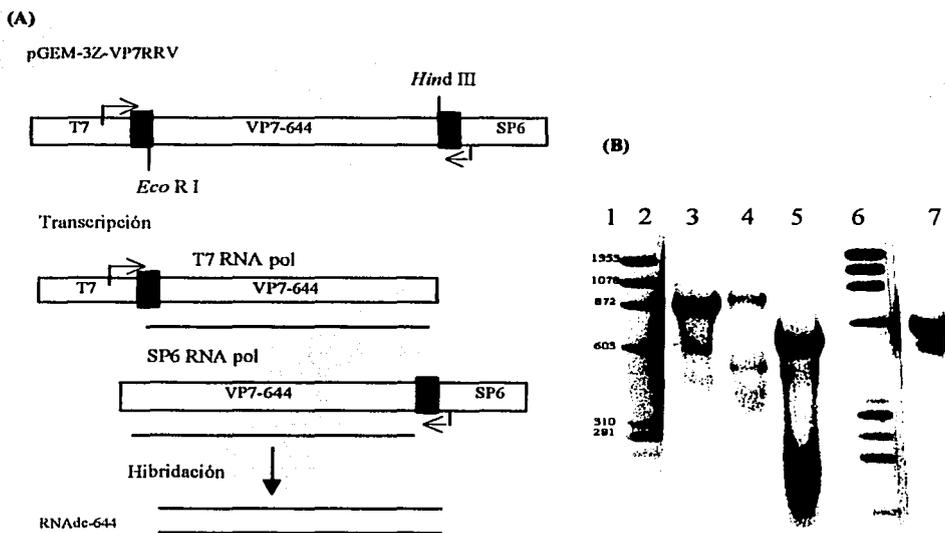


Figura 19. Generación de RNAdc. A) Representación esquemática de la generación de RNAdc (para mayor detalle ver materiales y métodos). (B) Generación de RNAdc (línea 5) por la hibridación de los RNAs sintetizados a partir de las RNA polimeras T7 (línea 3) y SP6 (línea 4), también se observa el RNAdc precipitado con LiCl (línea 7) el cual fue usado para las digestiones con las enzimas RNAsa tipo III y Dicer, para obtener de esiRNAs y d-siRNAs respectivamente; línea 1 y 6 marcador de peso molecular  $\phi x174/Hae III$ .

## **Generación de los esiRNAs por medio de digestiones parciales de RNAdc con la RNAsa tipo III de *E. coli*.**

El RNA de doble cadena fue digerido durante distintos tiempos con la RNAsa tipo III para obtener la mayor cantidad de esiRNAs aproximados a 21 pb. Como se muestra en la figura 20 (A), a partir de los 15 min de incubación a 37 °C con la RNAsa tipo III, el RNAdc se digirió en su mayoría a RNA's de doble cadena de aproximadamente 21pb, tamaño inferido por la comparación con un siRNA sintético control de 21pb. Sin embargo, al incrementar el periodo de incubación con la enzima, los pequeños RNA dúplex, se empiezan a degradar a tamaños más chicos que, como ya se mencionó, no activan los mecanismos de interferencia de RNA cuando éstos son transfectados a células de mamíferos. Por esto último, se decidió hacer incubaciones por 15 min a 37 °C con la enzima. Dicho tiempo se utilizó para la generación de esiRNAs de aproximadamente 21 pb obtenidos por la degradación del RNAdc. En la figura 20 (B), se muestran estos esiRNAs purificados que utilizamos para los ensayos de interferencia.

Para verificar si estos esiRNAs son capaces de activar la maquinaria de interferencia e inhibir específicamente la síntesis de la proteína VP7, se infectaron células MA104 sembradas en cajas de 48 pozos, con la cepa de rotavirus RRV a una multiplicidad de 1 virus/célula. Posteriormente, se lipofectaron las células con los esiRNAs a distintas concentraciones (200ng, 500ng y 1µg). A diez horas post lipofección, las células fueron lisadas con solución de lisis y las proteínas virales se analizaron por western blot. Se encontró que la síntesis de todas las proteínas virales disminuyó en presencia de los esiRNAs (datos no mostrados), por lo que se verificaron los tamaños de la población de los esiRNAs purificados.

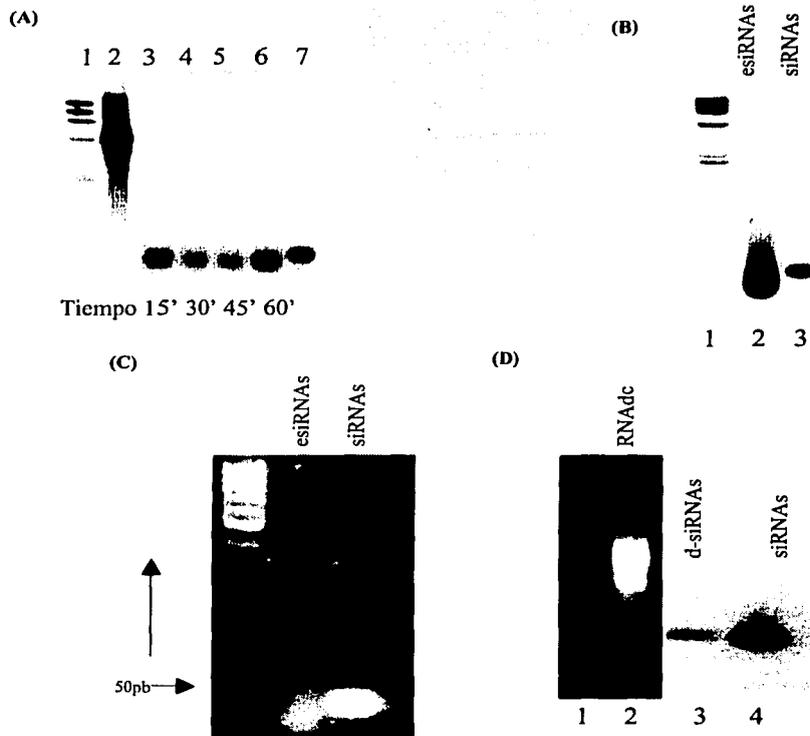


Fig. 20. Generación de esiRNAs y d-siRNAs por digestión del RNAdc de VP7 con la RNasa tipo III y Dicer, respectivamente. (A) Tiempos de digestión del RNAdc con la RNasa tipo III. El RNAdc fue incubado con la RNasa tipo III por el tiempo indicado a 37 °C, y después fue separado por electroforesis en gel de agarosa al 4%. Línea 1)  $\phi$ x174/*Hae* III; 2) RNAdc de VP7; 3-6) producción de esiRNAs a los periodos de incubación marcados; 7) siRNA de 21 pb, usado como marcador de tamaño. (B) esiRNAs purificados que se usaron para los ensayos de interferencia. Gel de agarosa al 3%, 1)  $\phi$ x174/*Hae* III, 2) esiRNAs purificados, 3) siRNA de 21 pb. (C) Gel de agarosa al 3% donde se observa que los esiRNAs purificados presentan tamaños mayores a 50 pb, 1) Marcador de DNA líder de 50 pb; 2) esiRNAs; 3) siRNAs. (D) Producción de d-siRNAs por digestión del RNAdc con la enzima Dicer de origen humano, por un tiempo de incubación de 12 hrs a 37 °C. Gel de agarosa al 3%. 1)  $\phi$ x174/*Hae* III, 2) RNAdc de VP7; 3) d-siRNAs de 21 pb; 4) siRNAs de 21 pb.

Como se muestra en la figura 20 (C), los tamaños de la población de los esiRNAs utilizados, varían desde menores de 21pb hasta mayores a 50pb. De éstos, los esiRNAs mayores a 30 pb muy probablemente estén activando el sistema de PKR, el cual inhibe la

traducción a nivel general debido a la fosforilación del factor  $2\alpha$  de la traducción en las células eucariontes. Estos esiRNAs mayores a 30 pb activan también a la 2'-5'-oligoadenilato sintetasa que generalmente es inducida por IFN, causante de la degradación no específica de RNAm al activar la vía de la RNasa L, lo cual genera una respuesta no específica de silenciamiento de genes (70).

Existen ejemplos de la literatura en los que se ha utilizado esta estrategia para generar esiRNAs y con éstos inducir la RNAi para que inhiban de manera específica la traducción de una proteína. En estos trabajos, sin embargo, se han utilizado esiRNAs de 21 a 25pb purificados por elución de geles de poliacrilamida (70).

### **Generación de d-siRNAs por la digestión del RNAdc por la Dicer de origen humano.**

Con el objetivo de generar d-siRNAs de VP7, el RNA de doble cadena fue digerido con la enzima Dicer como se describe en materiales y métodos. La figura 20 (D) muestra que los d-siRNAs generados a partir de esta digestión migran a la misma altura que los siRNAs sintéticos. Estos d-siRNAs se utilizaron para ensayos de interferencia. Para verificar si estos d-siRNAs son capaces de silenciar el gen de VP7, se realizó el siguiente experimento: se infectaron células MA104, en cajas de 48 pozos, con RRV a una multiplicidad de 1 virus/célula. Posteriormente se lipofectaron con diferentes concentraciones de d-siRNAs (250ng, 500ng, y 1 $\mu$ g), utilizando como control un siRNA sintético irrelevante (810ng). En la figura 21 se muestra que los d-siRNAs fueron capaces de inhibir la expresión de VP7. La inhibición observada fue dosis-dependiente respecto a la concentración de d-siRNAs. El análisis densitométrico de las proteínas demostró que la mayor inhibición de VP7 se obtuvo cuando se lipofectó con 1 $\mu$ g de d-siRNAs.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

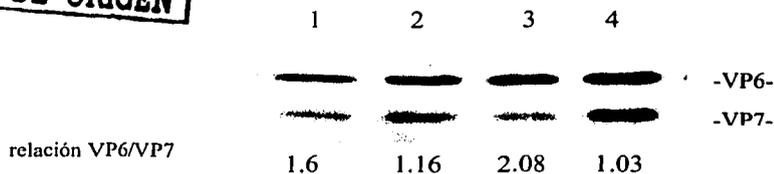


Fig. 21. Inhibición de la expresión de la proteína VP7 por ensayos de interferencia utilizando diferentes concentraciones de d-siRNAs. Western blot utilizando anticuerpos policlonales contra rotavirus, donde la síntesis de la proteína VP7 es comparada en relación a síntesis de la proteína VP6. Línea 1) 200 ng; 2) 500 ng; 3) 1 µg de d-siRNAs; 4) siRNA<sup>control</sup> (810 ng)

Esta estrategia resultó efectiva y específica para silenciar la expresión de VP7. Sin embargo la cantidad de d-siRNA's que se obtiene en cada reacción es muy pequeña y por lo tanto no se pueden realizar experimentos a gran escala. Por esta razón se decidió explorar la posibilidad de utilizar siRNA's de 21 pb que son complementarios a diferentes regiones del gen de VP7.

Los esiRNAs o d-siRNAs para silenciar un gen específico, se utilizan cuando no se tiene o no se ha encontrado un siRNA que silencie efectivamente el gen de interés. Al tener una población de esiRNAs o d-siRNAs que representan a todo el RNAm, aumenta la probabilidad de que éstos hibriden con su RNAm blanco y así, sea digerido por la endonucleasa que forma parte del complejo RISC y por exonucleasas celulares, inhibiendo en consecuencia, la expresión de la proteína.

En este trabajo se diseñaron tres siRNAs (ver materiales y métodos) y se verificó si eran capaces de inhibir específicamente a la proteína VP7, por medio del siguiente diseño experimental: se lipofectaron células MA104 en cajas de 48 pozos, con cada uno de los tres

siRNAs de VP7 que se sintetizaron *in vitro* y con el siRNA<sup>control</sup>, todos los siRNAs se usaron a una concentración de 810 ng. A las 36 hrs post lipofección, las células se infectaron con el rotavirus RRV a una multiplicidad de infección de 1 virus/célula. A las 12 horas post-infección las células fueron lisadas con solución de lisis y las proteínas analizadas por western blot con anticuerpos policlonales contra rotavirus. En la figura 22 se observa que los tres RNA interferentes inhiben la expresión de la proteína VP7 de manera específica.

El análisis densitométrico de las proteínas demostró que el interferente siRNA<sup>VP7-3</sup> fue capaz de inhibir hasta 6 veces la expresión de la proteína VP7. Los siRNA<sup>VP7-4</sup> y siRNA<sup>VP7-5</sup> inhibieron una vez la expresión de VP7, en comparación a la expresión de la misma en células lipofectadas con el siRNA<sup>control</sup>.

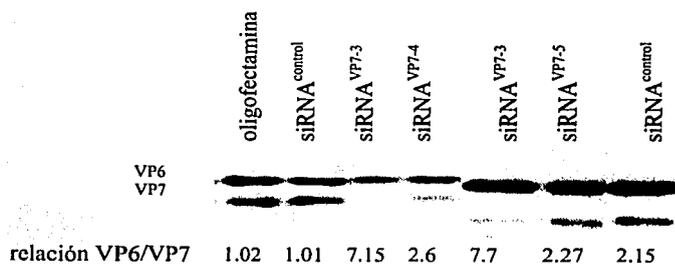


Fig. 22. Inhibición de la expresión de la proteína VP7, utilizando los siRNAs sintetizados *in vitro* de VP7 que diseñamos. Western blot utilizando anticuerpos policlonales contra rotavirus, donde se observa que los tres siRNAs de VP7 sintéticos, inhiben la expresión de la proteína VP7, siendo el interferente VP7-3 el que más disminuye la expresión.

Se eligieron los siRNA<sup>VP7-3</sup> y siRNA<sup>VP7-5</sup> y se mandaron a sintetizar químicamente. Éstos se utilizaron para analizar el efecto de la inhibición de la expresión de la proteína VP7 sobre la replicación viral. En este caso células MA104 se lipofectaron con los siRNA<sup>VP7-3</sup>, siRNA<sup>VP7-5</sup>, y siRNA<sup>control</sup>. A las 36 hrs post lipofección las células se infectaron con el

rotavirus RRV a una multiplicidad de 3 virus/célula, y la progenie viral producto de esta infección fue cosechada a las 12 hrs post-infección.

El título viral recuperado se determinó por un ensayo de infectividad. En la figura 23 se muestra que la producción de virus fue reducida a un 23.6 % cuando se utilizó el interferente siRNA<sup>VP7-3</sup> y a un 36.7 % cuando se utilizó el siRNA<sup>VP7-5</sup>: una cuarta parte y una tercera parte de infectividad, respectivamente, en comparación con la progenie viral obtenida cuando las células se lipofectaron con el siRNA<sup>control</sup>. Estos resultados indican que la inhibición de la expresión de VP7, inducida por la interferencia del RNA VP7-3 o VP7-5, resulta en la disminución de la producción de partículas virales infecciosas.

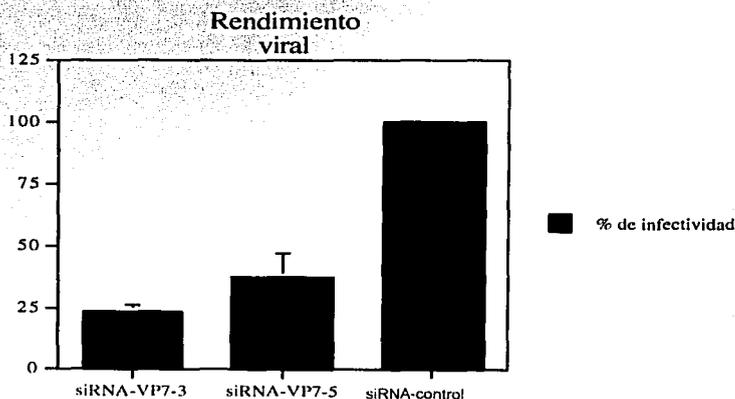


Fig. 23. Gráfico del rendimiento viral, el cual representa el efecto que tienen los siRNAs correspondientes a VP7 en la producción de la progenie viral, respecto a la progenie viral producida en presencia de un siRNA irrelevante (siRNA<sup>control</sup>).

Para caracterizar la síntesis de VP7 en células individuales, las células MA104 se sembraron en cubreobjetos y se lipofectaron con los siRNAs de VP7 y control. Las células se infectaron con RRV. A las 8 hrs post infección se realizó una inmunotinción con un

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

anticuerpo monoclonal dirigido contra VP7 (mAb60) y con un anticuerpo policlonal dirigido contra NSP5 (C6). Esta proteína no estructural se utilizó como control de infección.

Como se observa en la figura 24, cuando las células fueron lipofectadas con el siRNA<sup>control</sup>, la proteína VP7 y la proteína NSP5 colocalizaron, es decir, se detectaron en la misma célula. En cambio, cuando las células fueron lipofectadas con el siRNA<sup>VP7-3</sup>, en la mayoría de las células sólo se detectó la proteína NSP5, lo que indica que en estas células, a pesar de estar infectadas, la expresión de la proteína VP7 fue inhibida a niveles casi no detectables.

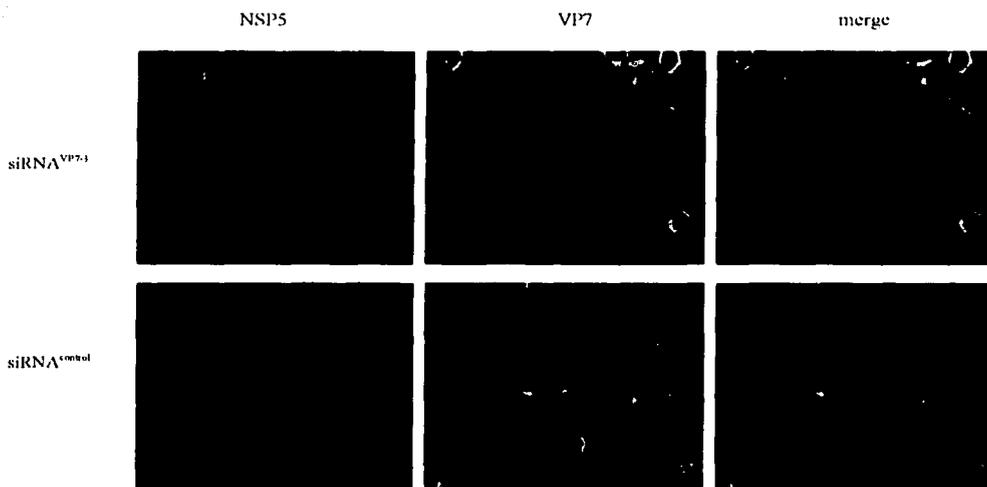


Fig. 24. Inhibición de la expresión de VP7. (A) Inmunodetección de VP7 y NSP5, en células lipofectadas con siRNA<sup>VP7-3</sup> o siRNA<sup>control</sup>.

Para evaluar el efecto de la inhibición de la expresión de la proteína VP7 durante la morfogénesis viral, las células MA104 se lipofectaron con los siRNAs y se infectaron con RRV. A las 24 hrs post-infección el lisado viral se cosechó y de ahí el virus se purificó mediante gradientes de CsCl. En la figura 25 (A) se observa que las partículas virales obtenidas a partir del gradiente de CsCl de la muestra lipofectada con el siRNA<sup>control</sup>,

presentan dos bandas. Las proteínas de estas bandas fueron analizadas por geles de poliacrilamida al 10% teñidos con plata. La banda 1 corresponde a las TLP's (partículas infecciosas) y la banda 2 corresponde a las DLP's (partículas no infecciosas que no presentan VP7 y VP4). Siendo la banda de las TLP's más intensa que la banda de las DLP's, se observa una concordancia con los datos de infectividad obtenidos, en donde hay mayor producción de partículas infecciosas.

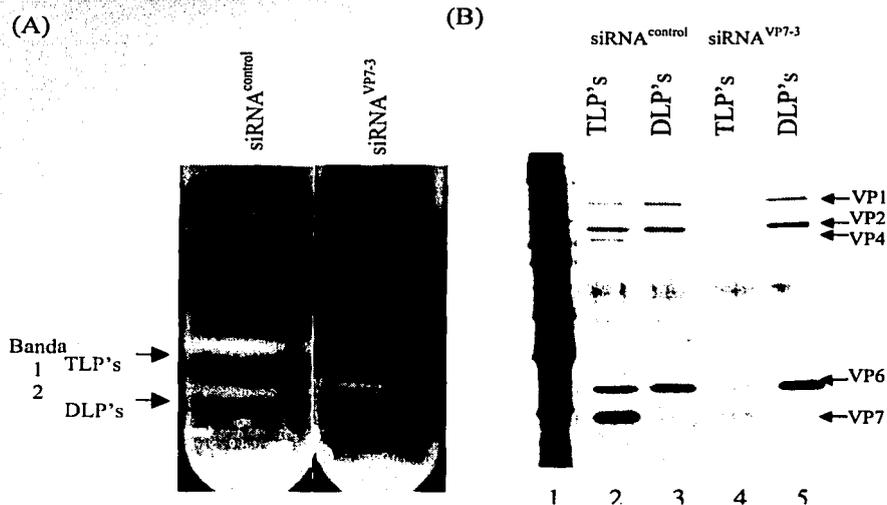


Fig. 25. (A) Producción de partículas virales en presencia del siRNA<sup>control</sup> (1) o del siRNA<sup>VP7-3</sup> (2), purificadas a partir de gradientes de CsCl. (B) Análisis de las proteínas de las partículas virales de las bandas obtenidas por el gradiente de CsCl. Gel de poliacrilamida al 10 % teñido con plata. 1) marcador de proteína (Gibco); 2) TLP's; 3) DLP's purificadas en presencia del siRNA<sup>control</sup>; 4) TLP's; 5) DLP's purificadas en presencia de siRNA<sup>VP7-3</sup>.

En cambio, en el gradiente de CsCl de las muestras lipofectadas con el siRNA<sup>VP7-3</sup> encontramos mayor producción de DLP's, mientras que la producción de TLP's es casi nula, lo que concuerda con los datos de infectividad donde la producción de las partículas infecciosas TLP's se redujo considerablemente al inhibir la expresión de la proteína VP7. Esta proteína junto con VP4 forman la capa externa del virión donde ambas funcionan como

ligandos para receptores celulares, permitiendo la entrada del virus a la célula para entonces poder replicarse. Estos datos sugieren que en ausencia de VP7 no se ensambla la proteína VP4 que es el otro constituyente de la capa externa.

Lo que nos interesa saber ahora es si estas DLP's están o no gemando hacia el lumen del RE cuando se inhibe la expresión de VP7. Como ya se mencionó, se ha propuesto que las proteínas VP7, VP4 y NSP4 forman un heteroligómero que podría jugar un papel importante durante la gemación de las DLP's hacia el RE donde adquieren una envoltura de membrana. Dicha membrana transitoria es removida cuando se lleva a cabo la maduración hacia TLP's (39). La inhibición de la expresión de la proteína VP4 por siRNAs, ha demostrado que no es necesaria para que las DLP's gemen hacia el RE. Tampoco lo es para que la proteína VP7 se ensamble o para que se remueva la envoltura lipídica formando partículas glabas o "spikeless TLP's", donde la capa externa sólo está formada por la proteína VP7 (15). Por otro lado, se sabe que el dominio carboxilo terminal de la proteína NSP4 es el que se une a las DLP's interaccionando directamente con VP6 (7, 44). Al parecer esta interacción es la que media la gemación de las DLP's hacia el lumen del RE. Se ha propuesto que NSP4 puede estar involucrada en la remoción de la envoltura de membrana durante la morfogénesis viral por algún mecanismo que aún no se ha descrito (64, 65). El tratamiento con drogas como la tunicamicina, que inhibe la N-glicosilación, o con taspigargina que inhibe la ATPasa de  $Ca^{2+}$  del RE, muestra que hay una gran acumulación de partículas intermediarias envueltas con membrana (que presentan el heteroligómero) dentro del lumen del RE. Esto se debe a la inhibición de la glicosilación de las glicoproteínas NSP4 y VP7 (45, 51, 56, 60, 63) donde sólo la glicosilación de NSP4 es importante para que la membrana se remueva (52).

Tomando en cuenta estos antecedentes, suponemos que las DLP's podrían gemar hacia el lumen del RE cuando se inhibe la expresión de VP7. Lo que no sabemos es si estas DLP's se mantienen con esta membrana transitoria o la pierden por la acción de la proteína NSP4. Para identificar si estas partículas están envueltas por una membrana lipídica hemos tratado de purificar partículas envueltas de membrana producidas por el tratamiento con estas drogas durante la infección con rotavirus, pero no las hemos podido purificar por los métodos de purificación que utilizamos (gradientes de sacarosa y CsCl, datos no mostrados). Esta purificación se ha intentado con el objetivo de tener un control, para demostrar si las partículas están envueltas de membrana o no, cuando se inhibe la expresión de VP7. Además, se están realizando experimentos de microscopía electrónica de células infectadas con RRV y lipofectadas con los siRNA de VP7 y control, para cumplir con este mismo objetivo.

## Conclusiones

- Se construyó un baculovirus recombinante expresa una proteína que probablemente es la VP7 de Wa, la cual aparentemente no se glicosila en la línea celular Sf9.
- Se estandarizó una técnica para generar RNA de doble cadena, que pudo ser utilizado como sustrato por la RNasa tipo III o por la enzima Dicer para generar esiRNAs o d-siRNAs, respectivamente. Estos siRNAs se pueden usar para interferir la expresión de un gen específico.
- Se diseñaron tres siRNAs de VP7, siendo el siRNA<sup>VP7-3</sup> el que mayor efecto de inhibición tuvo en la expresión de la proteína VP7.
- La interferencia del RNA a través del siRNA<sup>VP7-3</sup> tuvo como resultado la disminución en la producción de las partículas infecciosas.
- Se encontró que en ausencia de VP7 la morfogénesis del virus se detiene y no se obtienen virus infecciosos, sólo se forman DLP's que no maduran hacia TLP's.

## Perspectivas

1. Realizar microscopía electrónica para identificar si las DLP's están gemando o no hacia el RE. Si se encuentra que las DLP's están gemando hacia el interior del RE, identificar si éstas aún presentan, o no, envoltura de membrana. Si las DLP's están envueltas realizar ensayos de inmunomicroscopía electrónica para estudiar si las proteínas VP4 y NSP4 se encuentran presentes en éstas.
2. Obtener una línea celular que exprese de manera estable el RNA interferente de VP7 constitutivamente. Esto se puede llevar a cabo por dos métodos: primero, que la hebra sentido y antisentido del siRNA se transcriban a partir de promotores individuales; o segundo, que la hebra antisentido y sentido se expresen bajo el mismo promotor, pero separadas por una secuencia que forme un asa o "loop" generando un shRNA (short hairpin RNA) que, al ser procesado, forma un siRNA duplex (66). Esta línea celular nos permitiría hacer ensayos para complementar fenotípicamente la expresión de VP7 con una proteína heteróloga de las cepas de rotavirus YM o de Wa. Mientras que para complementar con la misma proteína VP7 de RRV, es necesario mutagenizar silenciosamente el sitio de reconocimiento del RNAm por el siRNA para que éste no pueda hibridar con el RNAm y así se pueda traducir.

## Bibliografía

1. Ahlquist, P. 2002. RNA-dependent RNA polymerases, viruses, and RNA silencing. *Science* 296:1270-3.
2. Amarasinghe, A. K., I. Calin-Jageman, A. Harmouch, W. Sun, and A. W. Nicholson. 2001. *Escherichia coli* Ribonuclease III: Affinity Purification of hexahistidine - tagged enzyme and assays for substrate binding and cleavage. *In* A. W. N. A. Press. (ed.), *Methods in Enzymology: Ribonucleases, Part B.*, vol. 342.
3. Arias, C., and S. López. Los Rotavirus. *In* E. Martínez and J. C. Martínez (ed.), *Microbios*.
4. Arias, C. F., C. A. Guerrero, E. Mendez, S. Zarate, P. Isa, R. Espinosa, P. Romero, and S. Lopez. 2001. Early events of rotavirus infection: the search for the receptor(s). *Novartis Found Symp* 238:47-60; discussion 60-3.
5. Arias, C. F., S. Lopez, and R. T. Espejo. 1982. Gene protein products of SA11 simian rotavirus genome. *J Virol* 41:42-50.
6. Arias, C. F., P. Romero, V. Alvarez, and S. López. 1996. Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity. *J Virol*. 70:5832-39.
7. Au, K. S., W. K. Chan, J. W. Burns, and M. K. Estes. 1989. Receptor activity of rotavirus nonstructural glycoprotein NS28. *J Virol* 63:4553-62.
8. Bican, P., J. Cohen, A. Charpilienne, and R. Scherrer. 1982. Purification and characterization of bovine rotavirus cores. *J Virol* 43:1113-7.
9. Boyle, J. F., and K. V. Holmes. 1986. RNA-binding proteins of bovine rotavirus. *J Virol* 58:561-8.
10. Caust, J., S. M. Dyall, I. Lazdins, and I. H. Holmes. 1987. Glycosylation, an important modifier of rotavirus antigenicity. *Arch Virol* 96:123-34.
11. Ciarlet, M., and M. K. Estes. 1999. Human and most animal rotavirus strains do not require the presence of sialic acid on the cell surface for efficient infectivity. *J Gen Virol* 80:943-8.
12. Clarke, M. L., L. J. Lockett, and G. W. Both. 1995. Membrane binding and endoplasmic reticulum retention sequences of rotavirus VP7 are distinct: role of carboxy-terminal and other residues in membrane binding. *J Virol* 69:6473-8.
13. Coulson, B. S., L. E. Unicomb, G. A. Pitson, and R. F. Bishop. 1987. Simple and specific enzyme immunoassay using monoclonal antibodies for serotyping human rotaviruses. *J Clin Microbiol* 25:509-15.
14. Crawford, S. E., M. Labbe, J. Cohen, M. H. Burroughs, Y. J. Zhou, and M. K. Estes. 1994. Characterization of virus-like particles produced by the expression of rotavirus capsid proteins in insect cells. *J Virol* 68:5945-22.
15. Déctor, M. A., P. Romero, S. López, and C. F. Arias. 2002. Rotavirus gene silencing by small interfering RNAs. *EMBO reports* 3:1175-80.
16. Elbashir, S. M., J. Harborth, K. Weber, and T. Tuschl. 2002. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* 26:199-213.
17. Estes, M. K. 2001. Rotaviruses and their replication., p. 1747-1785. *In* B. N. Fields, D. N. Knipe, P. M. Howley, R. M. Chanock, J. L. Melnick, T. P. Monath, B. Roizman, and S. E. Straus (ed.), *Virology*, vol. 2. Raven Press, New York.

18. Estes, M. K., S. E. Crawford, M. E. Penaranda, B. L. Petrie, J. W. Burns, W. K. Chan, B. Ericson, G. E. Smith, and M. D. Summers. 1987. Synthesis and immunogenicity of the rotavirus major capsid antigen using a baculovirus expression system. *J Virol* 61:1488-94.
19. Estes, M. K., D. Y. Graham, E. M. Smith, and C. P. Gerba. 1979. Rotavirus stability and inactivation. *J Gen Virol*:403-8.
20. Fuentes Panana, E. M., S. Lopez, M. Gorziglia, and C. F. Arias. 1995. Mapping the hemagglutination domain of rotaviruses. *J Virol* 69:2629-32.
21. Gajardo, R., P. Vende, D. Poncet, and J. Cohen. 1997. Two proline residues are essential in the calcium-binding activity of rotavirus VP7 outer capsid protein. *J Virol* 71:2211-16.
22. Gilbert, J. M., and H. B. Greenberg. 1998. Cleavage of rhesus rotavirus VP4 after arginine 247 is essential for rotavirus-like particle-induced fusion from without. *J Virol* 72 (6):5323-27.
23. Guerrero, C. A., S. Zarate, G. Corkidi, S. Lopez, and C. F. Arias. 2000. Biochemical characterization of rotavirus receptors in MA104 cells. *J Virol* 74:9362-71.
24. Hammond, S. M., E. Bernstein, D. Beach, and G. J. Hannon. 2000. An RNA-directed nucleasa mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila cells*. *Nature* 404:293-6.
25. Hammond, S. M., A. A. Caudy, M. Myers, and H. G. J. 2002. Fragile X-related protein and VIG associate with the RNA interference machinery. *Genes Dev* 16:2491-6.
26. Hewish, M. J., Y. Takada, and B. S. Coulson. 2000. Integrins  $\alpha 2\beta 1$  and  $\alpha 4\beta 1$  can mediate SA11 rotavirus attachment and entry into cells. *J. Virol* 74:228-236.
27. Hoshino, Y., M. M. Sereno, K. Midthun, J. Flores, A. Z. Kapikian, and R. M. Chanock. 1985. Independent segregation of two antigenic specificities (VP3 and VP7) involved in neutralization of rotavirus infectivity. *PNAS* 82:8701-4.
28. Isa, P., S. Lopez, L. Segovia, and C. F. Arias. 1997. Functional and structural analysis of the sialic acid-binding domain of rotaviruses. *J Virol* 71:6749-56.
29. Jenn-Yah, Y., L. D. Stacy, and D. L. Turner. 2002. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *PNAS* 99:6047-52.
30. Kabcenell, A. K., and P. H. Atkinson. 1985. Processing of the rough endoplasmic reticulum membrane glycoproteins of rotavirus SA11. *J Cell Biol* 101:1270-80.
31. Kabcenell, A. K., M. S. Poruchynsky, A. R. Bellamy, H. B. Greenberg, and P. H. Atkinson. 1988. Two forms of VP7 are involved in assembly of SA11 rotavirus in endoplasmic reticulum. *J Virol* 62:2929-41.
32. Kapikian, A. Z. 2001. A rotavirus vaccine for prevention of severe diarrhoea of infants and young children: development, utilization and withdrawal. *Novartis Found Symp* 238:153-71; discussion 171-9.
33. Kapikian, A. Z., Y. Hoshino, and R. M. Chanock. 2001. Rotavirus., p. 1787-17833. // B. N. Fields, D. N. Knipe, P. M. Howley, R. M. Chanock, J. L. Melnick, T. P. Monath, B. Roizman, and S. E. Straus (ed.), *Virology*, vol. 2. Raven Press, New York.
34. Kawasaki, H., E. Suyama, M. Iyo, and K. Taira. 2003. siRNAs generated by recombinant human Dicer induce specific and significant but target site-independent gene silencing in human cells. *Nucleic Acids Res* 31:981-987.

35. Kouvelos, K., M. Petric, and P. J. Middleton. 1984. Comparison of bovine, simian and human rotavirus structural glycoproteins. *J Gen Virol* 65:1211-4.
36. Labbe, M., P. Baudoux, A. Charpilienne, D. Poncet, and J. Cohen. 1994. Identification of the nucleic acid binding domain of the rotavirus VP2 protein. *J Gen Virol* 75:3423-30.
37. Larralde, G., and M. Gorziglia. 1992. Distribution of conserved and specific epitopes on the VP8 subunit of rotavirus VP4. *J Virol* 66:7438-43.
38. Lopez, S., C. F. Arias, E. Mendez, and R. T. Espejo. 1986. Conservation in rotaviruses of the protein region containing the two sites associated with trypsin enhancement of infectivity. *Virology* 154:224-7.
39. Maass, D. R., and P. H. Atkinson. 1990. Rotavirus proteins VP7, NS28, and VP4 form oligomeric structures. *J Virol* 64:2632-41.
40. Mackow, E. R., J. W. Barnett, H. Chan, and H. B. Greenberg. 1989. The rhesus rotavirus outer capsid protein VP4 functions as a hemagglutinin and is antigenically conserved when expressed by a baculovirus recombinant. *J Virol* 63:1661-8.
41. Mattion, N. M., J. Cohen, and M. K. Estes. 1994. The rotavirus proteins., p. 169-249. *In* A. Z. Kapikian (ed.), *Viral infections of the gastrointestinal tract*. Marcel Dekker, New York.
42. Mendez, E., C. F. Arias, and S. Lopez. 1993. Binding to sialic acids is not an essential step for the entry of animal rotaviruses to epithelial cells in culture. *J Virol* 67:5253-9.
43. Mendez, E., C. F. Arias, and S. Lopez. 1996. Interactions between the two surface proteins of rotavirus may alter the receptor-binding specificity of the virus. *J Virol* 70:1218-22.
44. Meyer, J. C., C. C. Bergmann, and A. R. Bellamy. 1989. Interaction of rotavirus cores with the nonstructural glycoprotein NS28. *Virology* 171:98-107.
45. Michelangeli, F., F. Liprandi, M. E. Chemello, M. Ciarlet, and M. C. Ruiz. 1995. Selective depletion of stored calcium by thapsigargin blocks rotavirus maturation but not the cytopathic effect. *J Virol* 69:3838-47.
46. Mirazimi, A., and L. Svensson. 2000. ATP is required for correct folding and disulfide bond formation of rotavirus VP7. *J Virol* 74:8048-52.
47. Murphy, C. I., H. Piwnica-Worms, S. Grünwald, and W. G. Romanov. 1997. Expression of proteins in insect cells using baculovirus vectors., p. 16.9.1-16.12.6. *In* F. D. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl (ed.), *Current Protocols in Molecular Biology*, vol. 3, Estados Unidos de Norteamérica.
48. Myers, J. W., J. T. Jones, T. Meyer, and J. E. Ferrell. 2003. Recombinant Dicer efficiently converts large dsRNAs into siRNAs suitable for gene silencing. *Nat Biotechnol* 21:324-8.
49. Patton, J. T., J. Hua, and E. A. Mansell. 1993. Location of intrachain disulfide bonds in the VP5\* and VP8\* trypsin cleavage fragments of the rhesus rotavirus spike protein VP4. *J Virol* 67:4848-55.
50. Patton, J. T., M. T. Jones, A. N. Kalbach, Y. W. He, and J. Xiaobo. 1997. Rotavirus RNA polymerase requires the core shell protein to synthesize the double-stranded RNA genome. *J Virol* 71 (12):9618-26.

51. Perez, J. F., M. E. Chemello, F. Liprandi, M. C. Ruiz, and F. Michelangeli. 1998. Oncosis in MA104 cells is induced by rotavirus infection through an increase in intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration. *Virology* 252:17-27.
52. Petrie, B. L., M. K. Estes, and D. Y. Graham. 1983. Effects of tunicamycin on rotavirus morphogenesis and infectivity. *J Virol* 46:270-4.
53. Plasterk, R. H. 2002. RNA silencing: the genome's immune system. *Science* 296:1263-5.
54. Poruchynsky, M. S., and P. H. Atkinson. 1988. Primary sequence domains required for the retention of rotavirus VP7 in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 107:1697-706.
55. Poruchynsky, M. S., and P. H. Atkinson. 1991. Rotavirus protein rearrangements in purified membrane-enveloped intermediate particles. *J Virol* 65:4720-7.
56. Poruchynsky, M. S., D. R. Maass, and P. H. Atkinson. 1991. Calcium depletion blocks the maturation of rotavirus by altering the oligomerization of virus-encoded proteins in the ER. *J Cell Biol* 114:651-6.
57. Poruchynsky, M. S., C. Tyndall, G. W. Both, F. Sato, A. R. Bellamy, and P. H. Atkinson. 1985. Deletions into an NH<sub>2</sub>-terminal hydrophobic domain result in secretion of rotavirus VP7, a resident endoplasmic reticulum membrane glycoprotein. *J Cell Biol* 101:2199-209.
58. Prasad, B. V., G. J. Wang, J. P. Clerx, and W. Chiu. 1988. Three-dimensional structure of rotavirus. *J Mol Biol* 199:269-75.
59. Prasad, B. V. V., R. Rothnagel, C. Q. Y. Zeng, J. Jakana, J. A. Lawton, W. Chiu, and M. K. Estes. 1996. Visualization of ordered genomic RNA and localization of transcriptional complexes in rotavirus. *Nature* 382 (6590):471-3.
60. Ruiz, M. C., A. Charpilienne, F. Liprandi, R. Gajardo, F. Michelangeli, and J. Cohen. 1996. The concentration of Ca<sup>2+</sup> that solubilizes outer capsid proteins from rotavirus particles is dependent on the strain. *J Virol* 70 (8):4877-83.
61. Sijen, T., J. Fleenor, F. Simmer, K. L. Thijssen, S. Parrish, L. Timmons, R. H. Plasterk, and A. Fire. 2001. On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* 107:465-76.
62. Su, C. Q., Y. L. Wu, H. K. Shen, D. B. Wang, Y. H. Chen, D. M. Wu, L. N. He, and Z. L. Yang. 1986. An outbreak of epidemic diarrhoea in adults caused by a new rotavirus in Anhui Province of China in the summer of 1983. *J Med Virol* 19:167-73.
63. Suzuki, H., T. Sato, T. Konno, S. Kitaoka, T. Ebina, and N. Ishida. 1984. Effect of tunicamycin on human rotavirus morphogenesis and infectivity. Brief report. *Arch Virol* 81:363-9.
64. Tian, P., J. M. Ball, C. Q. Y. Zeng, and M. K. Estes. 1996. The rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 possesses membrane destabilization activity. *J Virol* 70 (10):6973-81.
65. Tian, P., M. K. Estes, Y. Hu, J. M. Ball, C. Q. Zeng, and W. P. Schilling. 1995. The rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 mobilizes Ca<sup>2+</sup> from the endoplasmic reticulum. *J Virol* 69:5763-72.
66. Tuschl, T. 2002. Expanding small RNA interference. *Nat Biotechnol* 20:446-8.
67. Tuschl, T., P. D. Zamore, R. Lehmann, D. P. Bartel, and P. A. Sharp. 1999. Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev* 13:3191-7.

68. Vaistij, F. E., L. Jones, and D. C. Baulcombe. 2002. Spreading of RNA targeting and DNA methylation in RNA silencing requires transcription of the target gene and a putative RNA-dependent RNA polymerase. *Plant Cell* 14: 857-67.
69. Villatorio, A. A. 2001. Caracterización de la unión del rotavirus humano, cepa Wa, a su célula huésped. Licenciatura. UNAM, Cuernavaca.
70. Yang, D., F. Buchholz, Z. Huang, A. Goga, C. Chen, F. M. Brodsky, and J. M. Bishop. 2002. Short RNA duplexes produced by hydrolysis with *Escherichia coli* RNase III mediate effective RNA interference in mammalian cells. *PNAS* 99:9942-7.
71. Yolken, R., J. S. Arango, J. Eiden, and S. Vonderfecht. 1988. Lack of genomic reassortment following infection of infant rats with group A and group B rotaviruses. *J Infect Dis* 158:1120-3.
72. Zamore, P. D. 2002. Ancient pathways programmed by small RNAs. *Science* 296:1265-9.
73. Zarate, S. 2002. Caracterización de los dominios funcionales de la proteína VP4 de los rotavirus. Doctorado. UNAM, Cuernavaca.
74. Zarate, S., M. A. Cuadras, R. Espinosa, P. Romero, K. O. Juarez, M. Camacho-Nuez, C. F. Arias, and S. Lopez. 2003. Interaction of rotaviruses with Hsc70 during cell entry is mediated by VP5. *J Virol* 77:7254-60.
75. Zarate, S., R. Espinosa, P. Romero, C. A. Guerrero, C. F. Arias, and S. Lopez. 2000. Integrin alpha2beta1 mediates the cell attachment of the rotavirus neuraminidase-resistant variant nar3. *Virology* 278:50-4.
76. Zhu, Y., Y. Qi, D. Liu, M. N. Joshua, and Y. Wang. 1998. A novel expression system based on host-range expansion of baculovirus. *J Virol Methods* 76:101-8.