



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Clonación del gene de VP2, expresión en *E. coli* de los genes de VP2 y NSP3, y producción del suero hiperinmune anti-NSP3 del rotavirus SA11

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

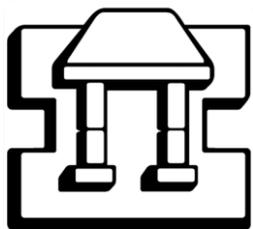
BIÓLOGO

PRESENTA:

MAXIMINO SANTIAGO MÉNDEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. LUIS PADILLA NORIEGA



Octubre, 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatoria

A mis Padres, a quienes agradezco de todo corazón por sus esfuerzos para que nunca me faltara nada, por su amor, cariño y comprensión por confiar en mis decisiones. En todo momento los llevo conmigo.

A Karlis, a ti amor que siempre estuviste presente en cada momento de este proyecto apoyándome y dando ánimos para seguir adelante en los momentos difíciles y buenos.

Gracias por creer en mí.

A mis hermanos Nancy y Omar por darme su compañía y apoyo.

A mi Tío Juan Jesús por transmitirme sus experiencias, darme ánimos durante todo este periodo y por aquellas charlas tan placenteras.

Y todo aquel que me brindo su ayuda en la culminación de mi tesis y mi carrera.

Agradecimientos

La realización de esta tesis fue financiada parcialmente por los proyectos:

51029-Z del Fondo Sectorial de Investigación para la educación del Consejo Nacional de Ciencia y tecnología (CONACyT), México.

IN224809 e IN210906 del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIII), Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Agradecimientos

La realización de esta tesis es un esfuerzo en donde varias personas me apoyaron y alentaron para seguir, acompañándome en los momentos difíciles y de alegría. Nombrar a cada una de estas personas resultaría en una lista interminable, porque afortunadamente conté con mucha gente que me ayudó y a cada uno ellos les doy mis más sinceros agradecimientos.

Agradezco al Dr. Luis Padilla Noriega por haber depositado su confianza en mi persona, por la paciencia, por el apoyo y por la dirección de este trabajo. Al Dr. Carlos Guerrero Hernández por transmitirme sus conocimientos y experiencias para mejorar la tesis. Al Dr. Renato León Rodríguez por sus consejos durante este proyecto y, por último a la M.V.Z. Georgina Díaz Herrera por el apoyo brindado en el bioterio.

A mis sinodales Dr. Rodolfo de la Torre Almaraz, M. en C. Ma. de Jesús Laura Castañeda Partida, Dr. Diego Julio Arenas Aranda y Dr. Maximiliano Ibarra Barajas por la revisión de esta tesis.

Gracias también a mis compañeros del laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM y de la FES-Iztacala, UNAM por brindarme su apoyo y amistad.

Muchas Gracias a todos.

ÍNDICE GENERAL.

RESUMEN.....	6
INTRODUCCIÓN	7
CLASIFICACIÓN	9
ESTRUCTURA DEL VIRIÓN.....	10
GENOMA Y PROTEÍNAS.....	12
FISIOPATOLOGÍA	17
CICLO REPLICATIVO	17
PROTEÍNA VP2	23
PROTEÍNA NSP3.....	25
JUSTIFICACIÓN	27
HIPÓTESIS.....	28
OBJETIVO GENERAL	29
OBJETIVOS PARTICULARES	29
MATERIALES Y MÉTODOS	30
DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA PROTEÍNA VP2.....	30
DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA PROTEÍNA NSP3	51
RESULTADOS	59
PROTEÍNA VP2.....	59
PROTEÍNA NSP3	73
DISCUSIÓN.....	84
CONCLUSIONES	91
ANEXO.....	93
REFERENCIAS.....	95

Tabla de abreviaturas.

Abreviatura	Significado
°C	Grados Celsius
µg	Microgramos
µL	Microlitro
µM	Micromolar
aa	Aminoácidos
AMC	Anticuerpos monoclonales
cDNA	DNA copia
Core	Partículas de una capa
DLPs	Partículas de dos capas
DO.	Densidad óptica
hrs. o hr.	Horas u hora
kb	Kilo bases
kDa	Kilodaltons
L	Litro
M	Molar
min.	Minuto o minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
pb	Pares de bases
PM	Peso molecular
pmol	Picomol
RNAcs	RNA cadena sencilla
RNA _{dc}	RNA de doble cadena
RNA _m	RNA mensajero
rNSP3	NSP3 recombinante
rpm	Revoluciones por minuto
RV	Rotavirus
rVP2	VP2 recombinante
seg.	Segundo o segundos
TLPs	Partículas de tres capas

Resumen

La familia *Reoviridae* incluye el género *Rotavirus* (RV), y el grupo A de este género es el principal agente etiológico de gastroenteritis en niños menores de 5 años. Los viriones de RV se estructuran de tres capas, la externa formada por las proteínas VP4 y VP7, la intermedia por la proteína VP6 y la interna por VP2. La capa de VP2 encierra otras dos proteínas, VP1 y VP3, y el genoma compuesto por once segmentos de RNA de doble cadena (RNAdc), los cuales codifican para 6 proteínas estructurales (VP1-VP4, VP6 y VP7) y 6 proteínas no estructurales (NSP1-NSP6). La proteína VP2 está involucrada en el proceso de replicación viral siendo un cofactor esencial para la RNA polimerasa viral dependiente de RNA, VP1, que utiliza los RNA mensajeros (RNAm) virales como moldes para producir RNA genómicos. La proteína no estructural 3 (NSP3) se une específicamente a la secuencia 3' terminal UGACC de los RNAm virales y al factor de iniciación de la traducción eIF4G, en el mismo dominio reconocido por la proteína celular PABP, expulsando a PABP de los complejos de iniciación e inhibiendo la traducción de los RNAm celulares. Con el propósito de diseñar instrumentos útiles para el estudio de VP2 y NSP3 nos propusimos a clonar y expresar el segmento 2 del rotavirus SA11 de simio que codifica la proteína VP2, en bacterias *E. coli*, y producir un suero hiperinmune contra la proteína NSP3 usando proteína recombinante producida también en *E. coli*.

Se amplificó el segmento 2 del RV SA11 que codifica para la proteína VP2 por RT-PCR y se insertó en el plásmido de expresión pET28b(+). El plásmido producido, pET28b-SA11-2, se usó para transformar bacterias *E. coli* BL21 (DE3) pPRIL, en donde se expresó la proteína recombinante VP2 (rVP2) realizando una inducción con IPTG. Se analizó la expresión de rVP2 por electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante teñido con azul de Coomassie y por Western blot se detectó la proteína recombinante con un anticuerpo monoclonal (AMC) anti-VP2.

Por otro lado, se expresó la proteína NSP3 del rotavirus SA11 a partir de bacterias *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el plásmido recombinante pET28b-SA11-7 que contiene el segmento 7 del RV SA11. Se purificó la proteína recombinante NSP3 (rNSP3) y se inmunizaron ratas con 5 dosis cada una. Se obtuvo el suero hiperinmune, se tituló y se demostró su especificidad contra la proteína NSP3 de RV mediante las técnicas de inmunoperoxidasa, inmunofluorescencia y Western blot.

Introducción

La gastroenteritis aguda es reconocida alrededor del mundo como la principal causa de morbilidad y mortalidad en niños menores de 5 años, provocando que este padecimiento sea de importancia de salud pública. Entre los agentes etiológicos que provocan este padecimiento se encuentran: toxinas, bacterias, parásitos y virus. Los rotavirus (RV) del grupo A son el principal agente etiológico de gastroenteritis aguda infantil, la asociación de éstos con diarrea fue descrita por primera vez en 1950, cuando fueron observados por microscopia electrónica en muestras fecales de monos y ratones, y dos décadas después la Dra. Bishop (1973) identificó RV en biopsias del intestino delgado de niños que presentaban diarrea de origen no bacteriano. Este virus fue bautizado con el nombre de RV proveniente del latín *rota* que significa rueda (Estes y Kapikian 2007; Carter y Saunders 2007).

Se estima que RV es responsable de 611,000 muertes al año a nivel mundial (Parashar et al. 2006), además de que representa fuertes gastos económicos tanto médicos como sociales. También son causantes de diarrea en muchas especies de mamíferos y de aves. Su distribución es cosmopolita y los porcentajes de infecciones son similares en países desarrollados como en países en desarrollo (Fig. 1), pero difieren en la tasa de mortalidad, teniendo el mayor número de decesos los países en desarrollo (Parashar et al. 2006; Estes y Kapikian 2007).

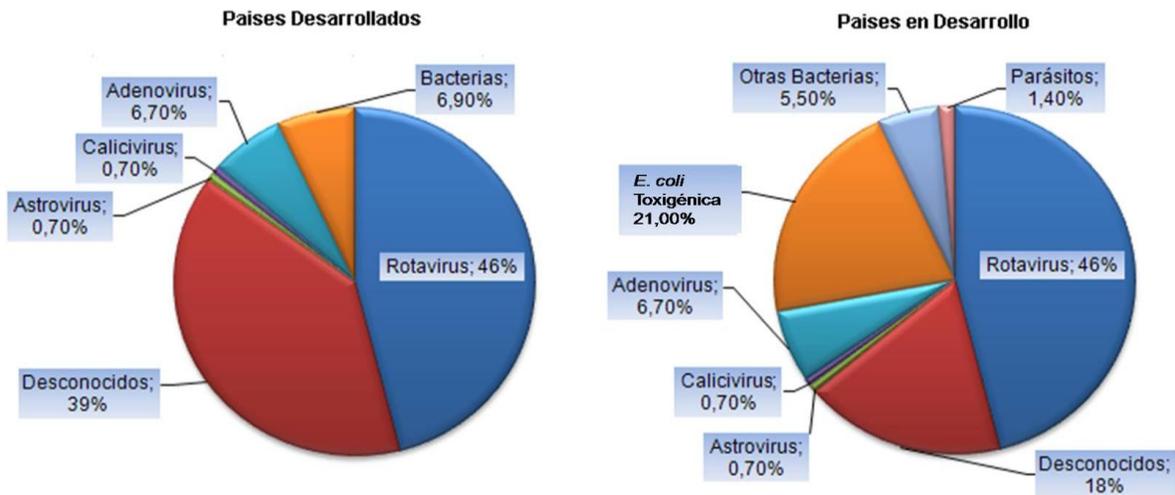


Figura 1. Estimado de varios agentes etiológicos que producen diarrea severa en infantes y jóvenes en países desarrollados y en desarrollo (Kapikian 1993).

La principal ruta de transmisión de RV es por vía fecal-oral, aunque se ha especulado que el contacto persona a persona con secreciones respiratorias y/o superficies contaminadas pudieran ser fuentes de transmisión, y también se han reportados casos de zoonosis (Cook et al. 2004). Una vez que el virus entra al hospedero éste infecta a los enterocitos maduros del intestino delgado al nivel del yeyuno mostrando un marcado tropismo por este tejido. La replicación del RV en los enterocitos tiene como consecuencia que las vellosidades de los enterocitos se vayan atrofiando y la función de absorción de los nutrientes y agua se vea disminuida, provocando una grave deshidratación. También se ha involucrado a una enterotoxina producida por RV y al sistema nervioso entérico como factores causales de diarrea. La finalización de la enfermedad se da al tercer o séptimo día después de la infección y la mejor forma de controlar la enfermedad es la rehidratación oral (Estes y Kapikian 2007).

Clasificación

La familia *Reoviridae* incluye a dos subfamilias (*Sedoreovirinae* y *Spinareovirinae*) y 15 géneros. El género *Rotavirus* se encuentra clasificada en el taxón *Sedoreovirinae* (Attoui y Mertens 2007). La familia comparte una serie de características morfológicas y moleculares particulares: presentan una geometría icosaédrica, no presenta una capa lipídica, tiene un genoma de RNA_{dc} segmentado, la partícula viral contiene todas las enzimas necesarias para la producción de sus RNAm, los cuales tienen la estructura CAP en el extremo 5' pero carecen de una cola de poliA en el extremo 3' y la replicación ocurre en el citoplasma (Parashar et al. 1998; Pesavento et al. 2006; Patton et al. 2006; Shaw y Greenberg 1999).

El género *Rotavirus* se divide en grupos, subgrupos y serotipos. La clasificación por grupos se determina en base a la proteína VP6 y actualmente se conocen solo siete grupos (A-G). Los RV del grupo A son los principales causantes de la diarrea infantil en humanos, el grupo B se ha asociado con brotes epidémicos de diarrea en adultos de China y la India, y el grupo C es el de menor importancia epidemiológica para el ser humano aunque se han dado casos esporádicos de infecciones sintomáticas. Los demás grupos afectan a mamíferos y algunas aves. Al igual que los grupos, la proteína VP6 determina los subgrupos I y II. Los determinantes de serotipo dependen de las proteínas de la superficie VP4 y VP7. El serotipo de VP7 es designado G (VP7 es una glucoproteína), mientras el serotipo de VP4 es designado como P (VP4 es sensible a proteasas). Hasta ahora se han identificado 14 serotipos G y 11 serotipos P. Para la realización del presente trabajo se utilizó la cepa de RV SA11 (simian antigen 11), que pertenece al grupo A, con serotipo G3 aislado originalmente de mono vervet (*Chlorocebus*

pygerythrus) (Hoshino y Kapikian 2000; Jayaram et al. 2004; Mathieu et al. 2001; Parashar et al. 1998; Gray et al. 2008; Estes y Kapikian 2007).

Estructura del virión

Las partículas de RV o viriones son icosaédricas, presentan un diámetro de aproximadamente 100 nm y están constituidos por tres capas concéntricas formadas por seis proteínas estructurales. Las partículas de triple capa (TLPs) son la forma infectiva, tienen un diámetro de aproximadamente 76.5 nm, presentan una simetría T=13 y están formadas en su capa más externa por 780 moléculas de la glicoproteína VP7 en un arreglo de 260 trímeros y de 60 espículas que están formadas posiblemente por trímeros de VP4 (Li et al. 2009). Las partículas de doble capa (DLPs) tienen la función de transcribir el genoma, produciendo los 11 RNA virales. Para el proceso de transcripción son importantes 132 canales que permiten el flujo de material acuoso y sustratos bioquímicos fuera y dentro de la cápside. Existen tres tipos de canales que rodean la capa externa, los 12 canales de tipo I que se ubican en los vértices de simetría cinco de la cápside, tiene un ancho de aproximadamente 4 nm, éstos penetran las tres capas del virión. Los 60 canales de tipo II se ubican cada uno pentavalentemente rodeando a los canales de tipo I, próximos a los puntos de interacción de las proteínas VP4, VP7 y VP6, y presentan una profundidad de 14 nm sin perforar la capa interna y un ancho de 4 nm en la superficie de la capa externa. Por último las 60 canales de tipo III están localizados en posición hexavalente en la cápside rodeando el eje de simetría tres y con una similitud en la profundidad de los canales de tipo II, pero con un ancho de 5.5 nm en la superficie de la capa externa (Pesavento et al. 2006; Hoshino y Kapikian 2000; Mathieu et al. 2001; Jayaram et al. 2004; Estes y Kapikian 2007; Fauquet et al. 2005).

Las DLPs tienen un diámetro de aproximadamente 70.5 nm, la capa intermedia está formada por 780 moléculas de la proteína VP6 en un arreglo de trímeros, presenta la misma simetría $T=13$ que las TLPs, siendo la proteína de mayor abundancia y el principal agente antigénico. Esta partícula es considerada como la mínima parte del virus que puede realizar la función de transcribir el genoma. Con respecto al core, también llamada partícula de una capa (SLP), presenta un diámetro de 50 nm, está formada por 120 moléculas de la proteína VP2 arregladas con una simetría de $T=1$. En el interior de la capa de VP2 se encuentra interactuando con las proteínas VP1/3 y el genoma. El genoma está formado por 11 moléculas de RNAdc, que se asocian de forma independiente con 11 de los 12 complejos de VP1/3 que están unidos en la superficie interna de VP2 ubicados en los ejes de simetría cinco (Pesavento et al. 2006; Hoshino y Kapikian 2000; Mathieu et al. 2001; Jayaram et al. 2004; Estes y Kapikian 2007; Fauquet et al. 2005).

En relación a la organización del genoma de RV, éste forma una estructura dodecahédrica, en la cual interactúa con la capa de VP2, y son empaquetados alrededor de los complejos de transcripción (VP1 y VP3) localizados en los vértices icosaédricos (Fig. 2) (Prasad et al. 1996; Pesavento et al. 2001).

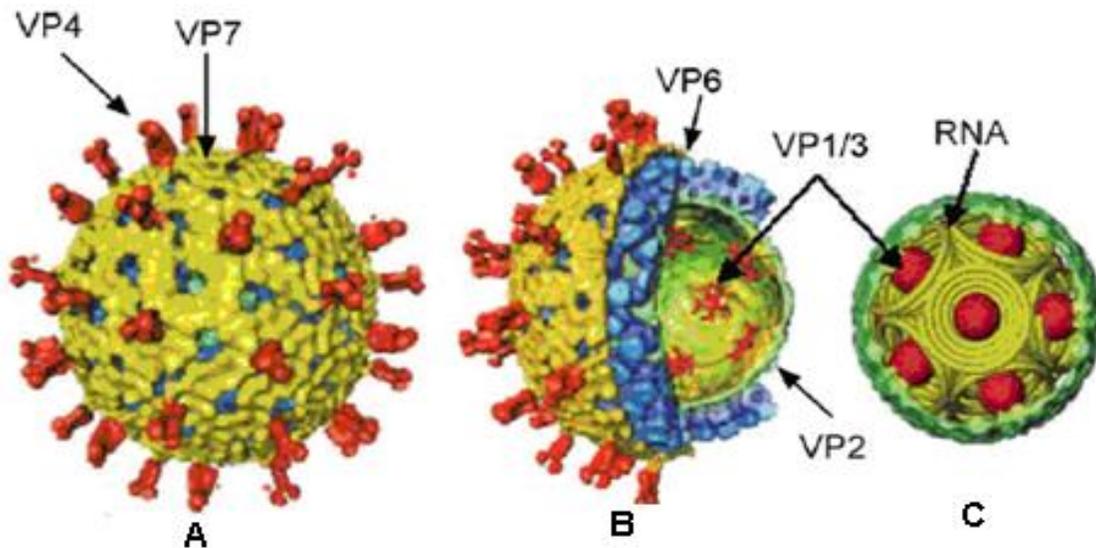


Figura 2. Estructura tridimensional de RV. A) Reconstrucción de TLPs. Las espículas de VP4 se muestran de color naranja y la capa externa de VP7 de color amarillo. B) Corte de una TLPs mostrando la capa intermedia VP6 de color azul y la capa interna VP2 de color verde. C) Corte una core de RV mostrando los complejos VP1/VP3 y la organización propuesta del genoma en espiral. Tomado y modificado de Jayaram (2004).

Genoma y proteínas

Cada segmento de RNAdc es monocistrónico, es decir que codifica para una proteína, excepto el segmento 11 el cual es bicistrónico. En total se codifican 12 proteínas: 6 estructurales y 6 no estructurales (Carter y Saunders 2007).

Los segmentos de RNAdc tienen entre 667 y 3,302 pb para la cepa SA11. Cabe mencionar que el RNA desnudo no es infeccioso, ya que para transcribirse, este genoma necesita de una RNA polimerasa viral que pueda utilizar RNA como molde y esta actividad enzimática no existe en células infectadas. Mediante comparación de secuencias de todos los segmentos de RNA de varias cepas de RV, se puede observar que todos los segmentos de RV están flanqueados por secuencias no traducidas, la longitud de estas es variable entre los diferentes segmentos, pero es hasta cierto punto conservada en los segmentos equivalentes de cepas aisladas de diferentes especies. Los

primeros 10 nucleótidos del extremo 5' y los últimos 8 nucleótidos del extremo 3' se encuentran altamente conservados entre los segmentos de las diferentes cepas de RV (Fig. 3). La presencia de estas secuencias podrían tener señales relevantes en varios procesos del ciclo replicativo del virión (Estes y Kapikian 2007; Shaw y Greenberg 1999). Se ha reportado que las secuencias no traducidas de los RNAm de RV presentan señales de replicación, como reporta Wentz (1996), quien describe que el RNAm correspondiente al segmento 9 de la cepa OSU requiere los últimos siete nucleótidos del extremo 3' para la síntesis de la cadena complementaria.

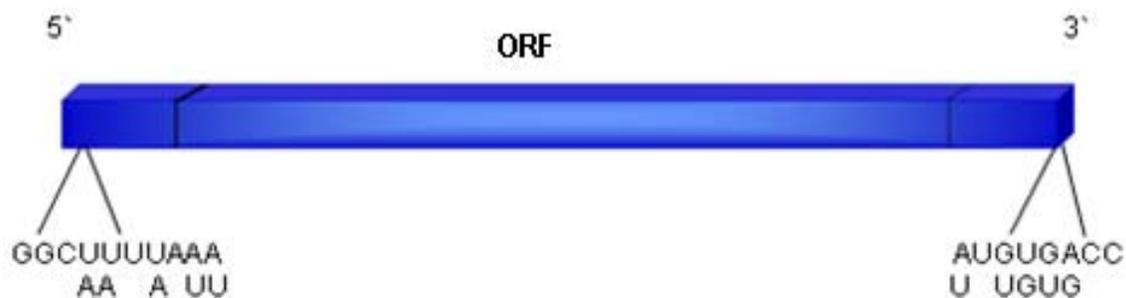


Figura 3. Estructura general de un segmento de RV. Tomado y modificado de Estes y Kapikian (2007).

Una característica importante del genoma de RV es la posibilidad de rearrreglos durante co-infecciones de la misma célula con dos cepas virales distintas, esto se debe a las posibles combinaciones de diferentes genes parentales, dando lugar a una gran variedad genética (Fig. 4) (Estes y kapikian 2007).

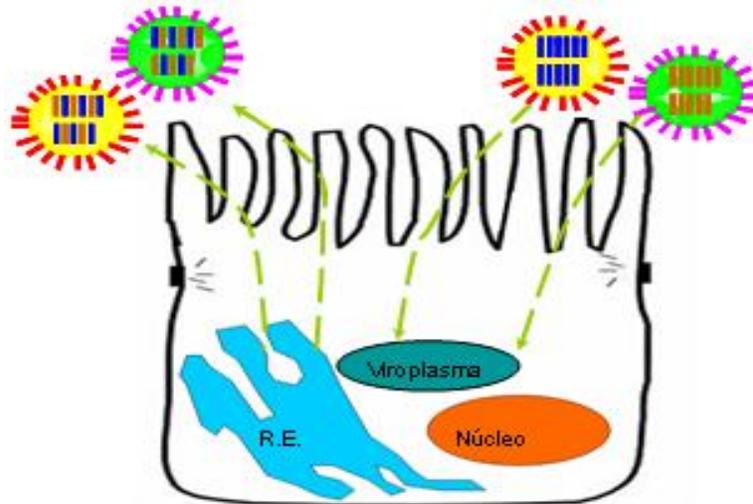


Figura 4. Célula polarizada infectada por dos cepas de RV, las cuales dan origen a dos cepas reasortidas.

Como se mencionó anteriormente, los viriones están formados por seis proteínas estructurales, que son denominadas con el prefijo VP (de las siglas en inglés: Viral Protein): VP1-VP4, VP6 y VP7. En células infectadas también se generan las proteínas no estructurales que se denominan con el prefijo NSP (de las siglas en inglés: Nonstructural Protein): NSP1-6, y participan en la replicación y morfogénesis de las partículas virales (Estes y Kapikian 2007; Carter y Saunders 2007).

En la Tabla 1 se muestran algunas características de cada segmento y proteínas del RV SA11.

Tabla 1. Segmentos genómicos y características generales de la cepa SA11 de RV.

Se muestran las características de cada uno de los segmentos de la SA11 de RV. Tomado y modificado de Estes y Kapian (2007).

Segmento de RNAdc (pb)	Marco de lectura	Proteína	Peso (kDa)	No. de copias/partícula	Modificación post-traducciona	Localización	Función
1 (3302)	18-3282	VP1	125	12	-	Capa interna	RNA polimerasa dependiente de RNA. Parte del complejo mínimo de replicación. Se une específicamente al extremo 3' de los RNAm virales. Parte del complejo de transcripción de RNAm virales.
2 (2690)	17-2659	VP2	102	120	Miristilación	Capa interna	Proteína estructural de la cápside interna. Actividad de unión al RNA de cadena sencilla (RNAs) y RNAdc. Necesario para la actividad de replicasa de VP1. Interacciona con NSP5 y VP1/6. Parte del complejo de transcripción de RNAm virales. Parte del complejo de replicación. Presenta dos motivos de cremallera de Leucina.
3 (2591)	50-2554	VP3	98	12	-	Capa interna	Guanilil- y metiltransferasa. Parte del complejo mínimo de replicación. Actividad de unión a RNAs. Parte del complejo de transcripción de RNAm virales con VP1.
4 (2362)	10 -2337	VP4	86	120	Corte proteolítico a VP5* y VP8*	Capa externa	Trímero. Espículas de la capa externa. Interacciona con VP6. Infectividad aumenta cuando la tripsina corta a VP4 dando origen a VP5* y VP8*. Hemaglutinina. Proteína de unión a la célula. Antígeno de neutralización de tipo P. Protección. VP5* y VP8* pueden interactuar con diferentes receptores de la célula.
		VP5*	60				
		VP8*	28				
5 (1611)	31-1515	NSP1	58	-	-	No estructural	Proteína viral muestra gran diversidad entre especies. Interactúa y degrada al IRF-3. Asociada al citoesqueleto. Se une en el extremo 5' del RNAm virales.
6 (1356)	24-1214	VP6	48	780	Miristilación	Capa media	Proteína más abundante. Proteína de la capa intermedia. Trimérica. Antígeno de grupo y subgrupo. Parte del complejo de transcripción de RNAm virales.
7 (1104)	26-970	NSP3	34	-	-	No estructural	Asociada al citoesqueleto. Proteína dimérica.

							Se une al extremo 3' de los RNAm virales. Compite con la PABP celular por la unión con eIF4G1. Inhibe la síntesis proteica de la célula huésped. Interactúa con el extremo 3' de los RNA virales.
8 (1059)	47-997	NSP2	36	-	-	No estructural	Proteína básica. Participa en la replicación. Unión no específica a RNAs. Se acumula en el viroplasma. Participa en la formación del viroplasma. Actividad NTPasa. Activada estabilizadora de la doble hélice. Octamérico Unión con NSP5 y VP1. Regula la autofosforilación de NSP5.
9 (1062)	49-1026	VP7	37	780	Glicosilación	Capa externa	Glicoproteína de la capa externa. Antígeno de neutralización de tipo G. Proteína integral de la membrana retículo endoplásmico. Proteína trimérica dependiente del Ca ²⁺ . Protección.
10 (751)	41-569	NSP4	20	-	Glicosilación	No estructural	Enterotoxina. Provoca un desequilibrio en la homeostasis de Ca ²⁺ . Participa en la morfogénesis. Receptores de unión de las DLPs a través del retículo endoplásmico. Protección.
11 (667)	22-615	NSP5	21	-	O-glicosilación fosforilación.	No estructural	Interacciona con VP2, NSP2 y NSP6. Fosfoproteína. Actividad autocatalítica cinasa aumentada por NSP2. Unión con los RNAs
	80-355	NSP6	11	-	-	No estructural	Segundo producto del ORF. Interacciona con NSP5. Se localiza en el viroplasma. Fosfoproteína.

Fisiopatología

Inicialmente se pensó que la diarrea por RV era causada por la mala absorción que se deriva de la descamación de los enterocitos de duodeno y yeyuno, pero diversos estudios han indicado que existen diferentes mecanismos que la provocan. La presencia de diarrea también depende de las características del virus y de su hospedero: especie y edad (Lorrot y Vasseur 2007b, 2007a; Estes y Kapikian 2007).

La diarrea puede ocurrir con daños no visibles a los tejidos o lesiones histológicas, aunque las infecciones también pueden ser asintomáticas. Se han establecido tres mecanismos que pueden inducir a la diarrea durante la infección de RV: mala absorción, la enterotoxina NSP4 y estimulación del sistema nervioso entérico, que pueden tener una mayor o menor importancia, dependiendo de la especie y del tiempo después del inicio de la enfermedad (Lorrot y Vasseur 2007b, 2007a; Angel et al. 2008).

La proteína NSP4 es la primera enterotoxina viral descubierta. Se ha detectado que NSP4 o un péptido derivado de dicha proteína (aa 112-175) induce diarrea directa o indirectamente. La predicción de que NSP4 puede ser liberado de células infectadas y tiene efecto paracrino en células no infectadas adyacentes ha sido confirmada en estudios *in vivo* e *in vitro* (Estes y Kapikian 2007; Desselberger y Gray 2009).

Ciclo Replicativo

Los mecanismos por el cual RV se une y entra a su célula hospedera son complejos y algunos detalles aún se desconocen. Las TLPs (los viriones infecciosos) se unen a la célula hospedera por la proteína VP4 de la capa externa (Ludert et al. 1996). La proteína VP4 sufre una proteólisis, por enzimas proteolíticas como la tripsina, sus subproductos

VP8* y VP5*, y la proteína VP7 de la capa externa interactúan con un número de proteínas de la superficie celular, dando el paso inicial de la infección. (Carter y Saunders 2007).

Hay dos posibles vías por las cuales el rotavirion puede entrar a la célula: penetración directa o endocitosis. La primera interacción del virión es probablemente con receptores que contienen ácido siálico en glicolípidos (Ciarlet y Estes 1999; Ciarlet et al. 2002; Isa et al. 2006). Se ha visto que otras cepas reconocen la galactosa (Jolly et al. 2001). Posteriormente a la interacción inicial con ácido siálico se piensa que ocurre la interacción con varias integrinas ($\alpha 2\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha x\beta 2$, $\alpha 4\beta 1$) y la proteína hsc70 actuando como co-receptores para mediar la internalización (Arias et al. 2001; Arias et al. 2002; Lopez y Arias 2004).

En la entrada del virion se forma un endosoma vesicular, en donde disminuye la concentración de Ca^{2+} muy probablemente como consecuencia de la acidificación mediada por una H^+ -ATPasa (Chemello et al. 2002). Cuando las concentraciones de Ca^{2+} en el endosoma son bajas, VP7 y VP5*/VP8* son desensamblados, la membrana del endosoma aparentemente se disuelve por efecto de VP5* (Angel et al. 2008). Aunque otros estudios indican una posible participación de tripsina inactiva asociada a la capa externa del virión, al disminuir la concentración de Ca^{2+} en el endosoma la capa externa se solubiliza liberando la tripsina, ésta se activa y realiza una proteólisis de la proteína VP7, los subproductos solubilizan la membrana endosomal y liberan las DLPs, las cuales son activas transcripcionalmente (Benureau et al. 2005). Los productos transcripcionales de cada uno de los 11 segmentos del genoma, en un proceso catalizado por VP1, son 11 copias de RNA de sentido positivo (RNA+), que servirán como RNAm

virales o cadenas molde en la replicación del genoma. Simultáneamente al proceso de transcripción, la proteína VP3 coloca la estructura Cap en el extremo 5' y no se añade cola de poliA. Los nucleótidos para sintetizar el RNA entran a las partículas a través de alguno de los tres tipos de canales y los transcritos son liberados de la partícula a través de los canales tipo 1 (Carter y Saunders 2007; Desselberger y Gray 2009).

La proteína NSP3 es un regulador traduccional, esta proteína se une al extremo 3' del RNAm viral y al factor de Iniciación eucariótico 4GI (eIF4GI), y como consecuencia inhibe la traducción celular (Vende et al. 2000). Sin embargo, la traducción viral puede ocurrir independiente de NSP3 (Montero et al. 2006)

Las proteínas virales se acumulan en el citoplasma en regiones electrodensas llamadas viroplasmos. Hay evidencia que NSP2 y NSP5 juegan un papel en la formación de estas estructuras, ya que al co-expresarlas en células no infectadas se forman estructuras similares (Fabbretti et al. 1999). Así mismo, la reducción de la expresión de NSP5 o NSP2 por RNA de interferencia inhibió la formación de dichas estructuras (Campagna et al. 2005). En los viroplasmos, en forma simultánea con la replicación, se ensambla el core del virión, compuesto por las proteínas VP1, VP2 y VP3, y los RNA virales (Carter y Saunders 2007; Desselberger y Gray 2009).

Como se mencionó anteriormente, en el viroplasma los RNA⁺ son utilizados como molde para la replicación del genoma. Un riguroso procedimiento de selección asegura que cada core reciba un segmento de cada uno de los 11 segmentos de RNA, un genoma completo. Este procedimiento, el cual opera para todos los virus con genomas multipartitas, supone el reconocimiento de una secuencia en cada segmento del genoma.

La síntesis de RNA de sentido negativo (RNA-) toma lugar durante la entrada de la cadena de RNA+ en el core, donde VP1, actúa otra vez como la RNA polimerasa viral (Carter y Saunders 2007; Desselberger y Gray 2009), se ha propuesto un modelo donde los pentámeros que forman dicha estructura tienen actividad replicasa. La RNA polimerasa VP1 y la enzima VP3 interactúan con el RNAm viral para formar un complejo pre-core que carece de actividad replicasa. En el viroplasma, los complejos que interactúan con dímeros de VP2, octámeros de NSP2 y dímeros de NSP5 produciendo una estructura que representa uno de los 12 vértices (pentámeros) del core, las cuales tienen actividad replicasa que cataliza la síntesis del RNAdc viral. Las propiedades de NSP2 y NSP5 sugieren que estas facilitan el empaquetamiento de los RNAm virales en el core durante la replicación del RNA (Fig. 5) (Patton 2001).

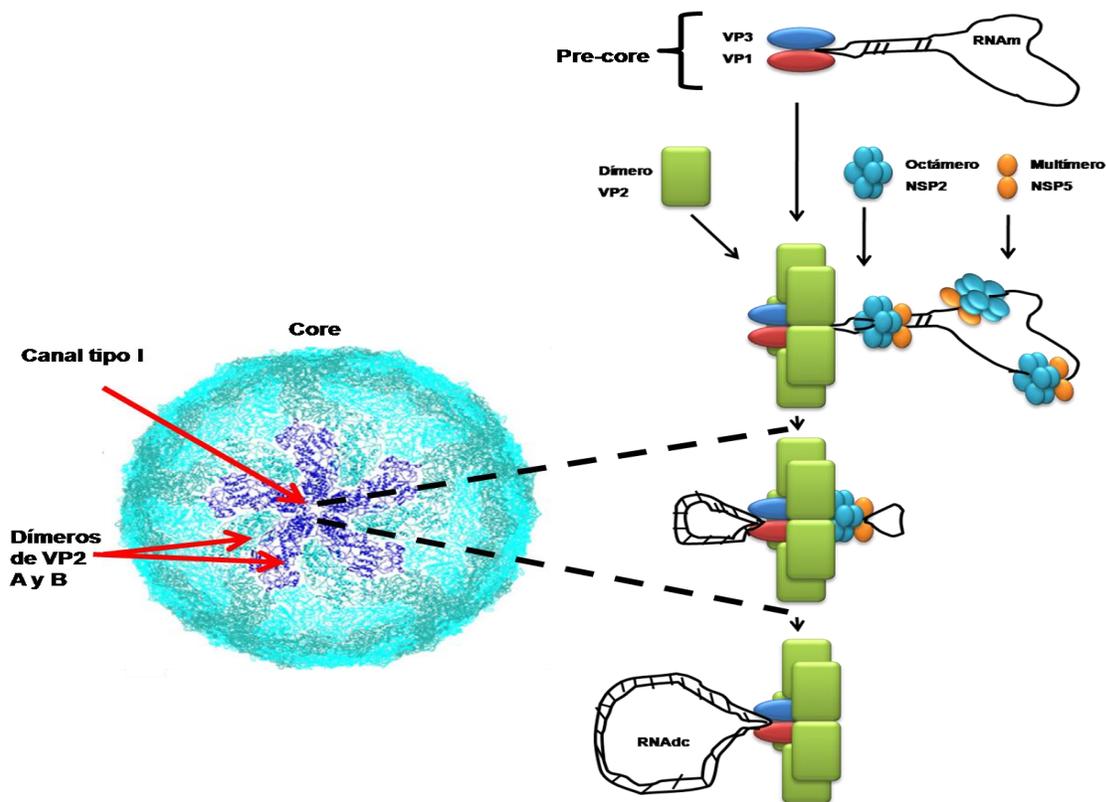


Figura 5. Modelo propuesto para la replicación del RNAdc viral (Patton, 2001), el cual se lleva a cabo en uno de los vértices (Canal tipo 1) del core. Tomado y modificado de McClain (2010).

Después de la replicación del genoma, VP6 es añadido al core, formando las DLPs. En este lugar ocurre una segunda fase de síntesis de RNA+, también llamada transcripción secundaria, con las DLPs recién ensambladas. La traducción de proteínas celulares disminuye, mientras la traducción de las proteínas virales continúa (Carter y Saunders 2007; Desselberger y Gray 2009).

Posteriormente las DLPs geman al retículo endoplásmico rugoso (RER), adquiriendo una membrana lipídica transitoria. Las proteínas VP7 y NSP4 son sintetizados y N-glicosilados en el RER, donde NSP4 actúa como un receptor intracelular para VP6. Después de unirse al virión inmaduro, se mueve a través de la membrana en una vesícula al interior del retículo endoplásmico rugoso (RER). En este compartimiento celular, la membrana transitoria se pierde junto con NSP4 para completar su maduración al incorporar VP7 (Carter y Saunders 2007; Desselberger y Gray 2009). Hay dudas si VP4 son añadidas en el RER o en otro lugar. Se ha propuesto que VP4 puede ser añadido después en un proceso desconocido, en la cual interactúa directa o indirectamente con balsas lipídicas próximas a la membrana plasmática. Los viriones son liberados por lisis en células no polarizadas y son secretadas por la capa apical de células polarizadas como la línea celular de carcinoma de colon de humano (Fig. 6) (Desselberger y Gray 2009; Chwetzoff y Trugnan 2006; Delmas et al. 2004).

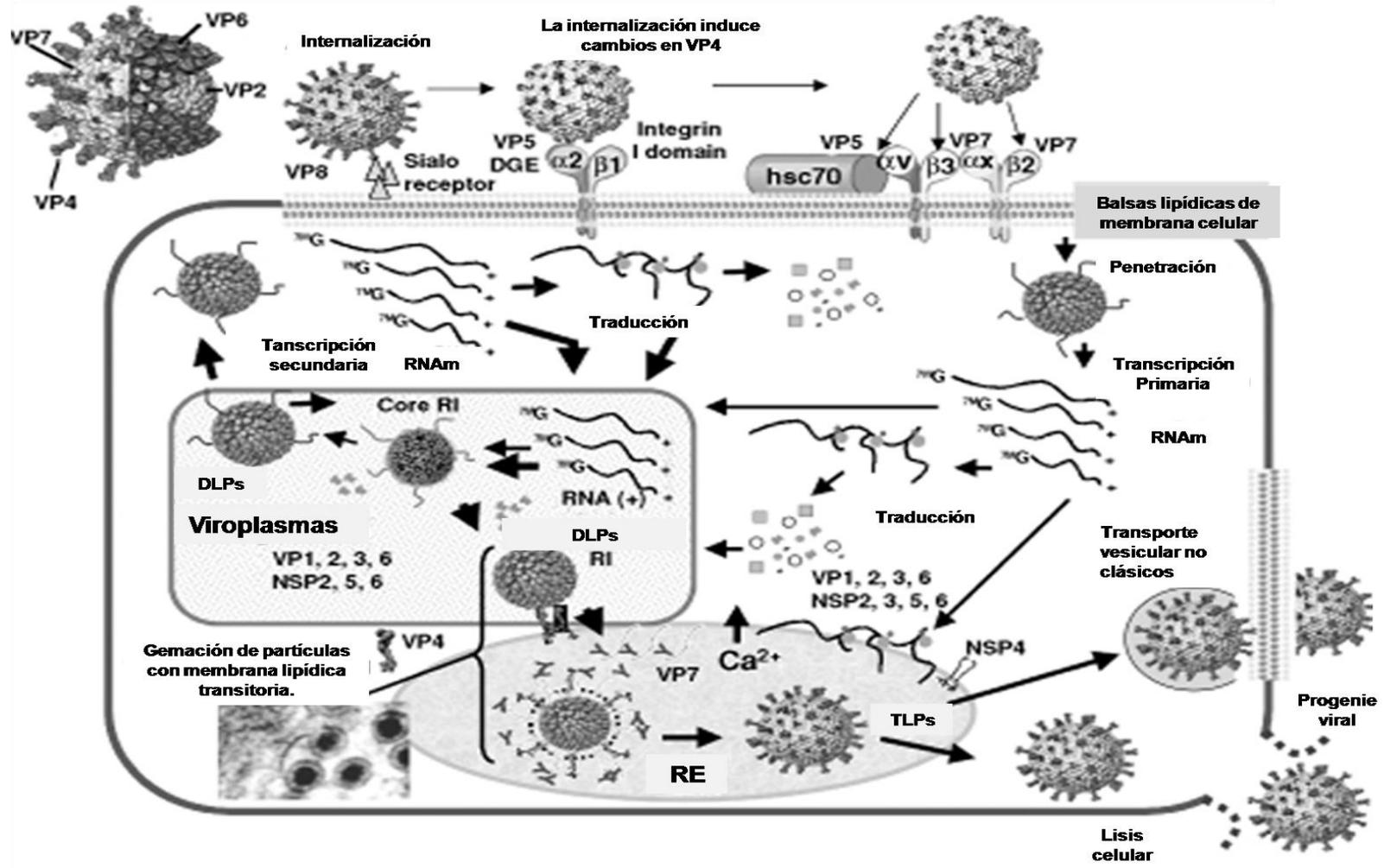


Figura 6. Esquemización del ciclo replicativo de RV. Tomado y modificado de Estes y Kapikian (2007).

Proteína VP2

La proteína VP2 es producto del segmento 2, es la proteína estructural más abundante del core (Bican et al. 1982). La expresión de rVP2 en células de *Spodoptera frugiperda* da como resultado la formación de partículas similares al core, esto indica que la capa interna del virión puede ser formada de manera independiente (Labbe et al. 1991).

VP2 sufre un cambio post-traducciona, ya que es miristilada, aunque se desconoce la función de este proceso, pero no es la única proteína viral que sufre una modificación post-traducciona (Clark y Desselberger 1988). El peso molecular (PM) de VP2 calculado a partir de la movilidad en electroforesis de gel de poliacrilamida de 94 kDa difiere del PM deducido de la secuencia de nucleótidos de 102.4 kDa. Esto puede ser resultado del alto porcentaje de estructuras alfa hélice en esta proteína (Estes y Cohen 1989).

El core de VP2 aloja en su interior las proteínas VP1 y VP3, las cuales interactúan con su extremo amino para ser encapsidados (Zeng et al. 1998). El complejo de estas dos proteínas virales y VP2 presenta actividad de síntesis del genoma viral (Patton et al. 1997; Mansell y Patton 1990). De igual forma la interacción de VP2 con la proteína VP6 es esencial para la actividad transcriptasa de las DLPs (Charpilienne et al. 2002). NSP5 es otra proteína que interactúa con VP2, y en este sentido se ha propuesto que NSP5 podría actuar como un adaptador entre NSP2 y el complejo de replicación VP1-VP2-VP3, en el proceso de empaquetamiento del RNAm viral (Berois et al. 2003).

VP2 presenta actividad de unión a los ácidos nucleicos (RNA cadena sencilla, RNAdc y DNA de doble cadena) (Boyle and Holmes 1986). El análisis de la secuencia de VP2 señala que posee dos dominios tipo cremalleras de leucinas localizados en los

aminoácidos (aa) 536-559 y 665-686, que podrían estar implicados en la dimerización de VP2 y en favorecer la unión de los ácidos nucleicos (Estes y Cohen 1989). En la cepa RF de RV bovino se encontró que el dominio de unión a los ácidos nucleicos se ubica entre los aa 1 al 132, y los motivos de cremallera de leucina no participaban en la unión de los ácidos nucleicos, pero podrían participar en procesos de la oligomerización de la proteína (Fig. 7) (Labbe et al. 1994).



Figura 7. Esquemización del segmento 2 de RV. En verde se muestra la región que interactúa con los ácidos nucleicos. En morado la región donde se ubican las cremalleras de leucina. Tomado y modificado de Estes y Cohen (1989).

Otra función recientemente descrita para la proteína de VP2 es la formación de estructuras semejantes a viroplasmos cuando es co-expresada con NSP5 en ausencia de NSP2 y la hiperfosforilación de NSP5 (Contin et al. 2010). Se ha descrito que la proteína VP2 presenta una variación genética que existe entre cepas de los distintos grupos de RV de dicha proteína. Además, para el grupo A de RV, se ha propuesto clasificar la cápside interna en subgrupos (McDonald and Patton 2008).

La proteína VP2 juega un papel importante en el ciclo de replicativo del RV, y aunque se conocen algunas de las funciones de la proteína, aun quedan interrogantes, por lo cual es necesario continuar el estudio de dicha proteína.

Proteína NSP3

La proteína NSP3 es producto del segmento 7 y presenta un PM de 34 kDa. NSP3 se distribuye en el citoplasma de células infectadas, con una posible asociación con el citoesqueleto (Mattion et al. 1992). NSP3 forma homodímeros asimétricos que se unen al extremo 3' de los RNAm virales en la secuencia UGACC, que es altamente conservada en las cepas de RV (Mattion et al. 1992; Poncet et al. 1993; Poncet et al. 1994; Rao et al. 1995; Deo et al. 2002) y también se une con eIF4GI compitiendo con la proteína de unión poliA (PABP) (Piron et al. 1998). La competencia entre NSP3 y PABP por eIF4GI facilita la traducción de los RNAm virales y la inhibición de la síntesis proteica del hospedero (Varani y Allain 2002; Vende et al. 2000; Padilla-Noriega et al. 2002), aunque estudios recientes indican que NSP3 no es requerida para la síntesis de proteínas virales, pero puede ser importante para la inhibición de la traducción de los RNAm celulares (Montero et al. 2006).

NSP3 también interacciona con la proteína celular RoXaN, de la cual se desconoce su función; ambas proteínas están involucradas con la localización nuclear de PABP-C1 en células infectadas por RV (Harb et al. 2008).

Se ha ubicado el dominio que une a NSP3 al RNA viral entre los aa 4-149 del extremo amino, mientras el dominio de unión al IFG41 se ubica en los últimos 107 aa del extremo carboxilo. Ambos dominios son separados por el dominio de dimerización entre los aa 150 y 206 (Piron et al. 1999; Suguna y Rao 2010). También se ha ubicado la región que interactúa con la proteína RoXaN, la cual se ubica entre los aa 163 y 240 (Fig. 8) (Vitour et al. 2004).

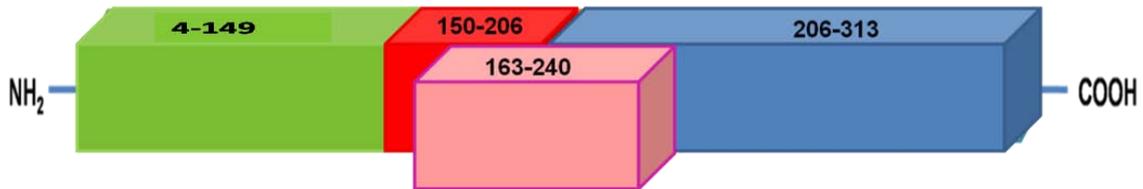


Figura 8. Esquematación del segmento 7 de RV. En verde se señala la región que interactúa con los RNAm virales, en rojo la ubicación del dominio de dimerización, en rosa la región que interactúa con RoXaN y en azul la región de interacción con el eIFG4.

La proteína NSP3 juega un papel importante en la traducción y síntesis de las proteínas virales, y recientemente se le ha asociado con la interacción de proteínas celulares. Por ello es necesario continuar el estudio de esta proteína, para un mejor entendimiento del ciclo replicativo de RV.

Justificación

A las proteínas VP2 y NSP3 se les han atribuido recientemente funciones o interacciones nuevas con otras proteínas de origen viral o celular; ésto abre una serie de interrogantes que deben ser respondidas para tener un mejor entendimiento del ciclo replicativo de RV y ampliar nuestros conocimientos sobre estos virus.

Por lo tanto, es necesario seguir desarrollando herramientas para el estudio de dichas proteínas. En nuestro caso particular, se realizará un proceso de expresión de la proteína VP2 en bacterias *E. coli*, para su posterior purificación y producción de un suero hiperinmune a futuro. En el caso de NSP3 se obtendrá un suero hiperinmune, el cual será utilizado para el estudio intracelular de dicha proteína en diversos proyectos del laboratorio. En conjunto, la clonación y expresión del segmento de VP2 de rotavirus en *E. coli*, así como la producción de rNSP3 y su uso para producir un suero hiperinmune, constituirá un ejercicio completo “gene-proteína-anticuerpo”, para transitar desde el gene a la producción de la proteína que codifica, y de ésta a la producción de un suero hiperinmune.

Hipótesis

“Si se clona el segmento 2 del RV SA11 en el vector de expresión pET28b(+), se podrá expresar la proteína recombinante en bacterias *E. coli*”.

“Si se inmuniza a ratas con la rNSP3, podremos obtener un suero hiperinmune, que podrá detectar dicha proteína en células de mamífero infectadas con RV”.

Objetivo General

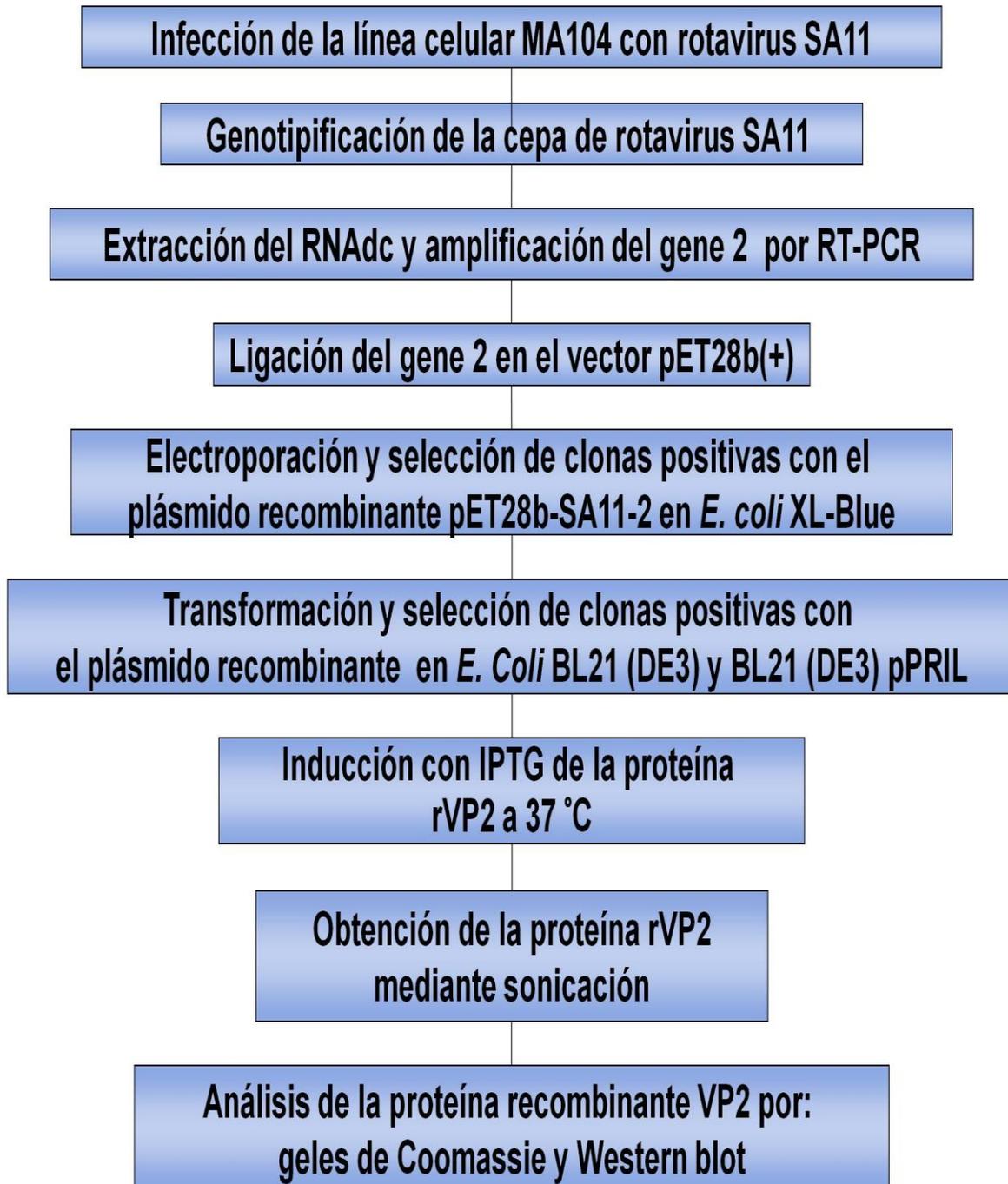
- Clonar y expresar al gene de VP2 de rotavirus en bacterias *E. coli*.
- Obtener un suero hiperinmune anti-NSP3 a partir de ratas inmunizadas con rNSP3 de rotavirus.

Objetivos particulares

- Amplificación el segmento 2 del del RT SA11 por RT-PCR a partir del RNA genómico viral.
- Clonación del cDNA del segmento 2 del RT SA11 en vector de expresión pET28b(+).
- Expresión de las proteínas rVP2 y rNSP3 en bacterias *E. coli*.
- Purificación de la proteína rNSP3 por medio de cromatografía de afinidad.
- Detección de la proteína NPS3 con los sueros hiperinmunes anti-NSP3 en células de mamífero infectadas con RV.

Materiales y métodos

Diseño experimental para la proteína VP2



Cultivo de células MA104 y BSC-1

Se utilizaron células MA104 (Donadas por el Dr. R. Wyatt de los Institutos Nacionales de Salud (NIH), E.U.A.) y BSC-1 (Donadas por el Dr. R. Rosales del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM). Se cultivaron en medio mínimo esencial de Eagle (MEM) con 7% de suero fetal de bovino (SFB) a una temperatura de 37 °C y 5% de CO₂ hasta alcanzar el 100% de confluencia celular.

Producción del RV SA11

La cepa utilizada para infectar las células MA104 fue SA11 del RV del grupo A (a partir del stock M2 preparado por Marta Méndez, Instituto de Biotecnología, UNAM, dicho stock fue renombrado como P1 de pase 1). Las células MA104 se hicieron crecer hasta obtener una monocapa confluyente en frascos F162 (las cuales contienen 1×10^5 células/cm² en confluencia, 1.6×10^7 células totales) a 37 °C y 5% de CO₂. El virus se activó con tripsina con una concentración final de 10 µg/mL a 37 °C por 30 min, las células fueron lavadas dos veces con 10 mL de MEM sin suero (MEM-ss), se retiró el medio, se añadió el virus previamente activado diluido en MEM-ss y se agregó tripsina extra para obtener una concentración final de 1 µg/mL para activar a los virus producidos y liberados al medio. Se incubó a 37 °C y 5% de CO₂, hasta observar efecto citopático (redondeamiento de las células y refracción a la luz), alrededor del día 1 al 5 post-infección. Se cosechó el virus congelando los medios infectados a -20 °C, posteriormente se sacaron los frascos con el medio congelado y se agitaron para que la escarcha raspase las paredes provocando la lisis celular. Se tomaron alícuotas del lisado de virus y se almacenaron a -20 °C. En este procedimiento se obtuvieron los pases P2 (producto de la primera amplificación P1 que se hizo de este virus) y P3 (producto de la segunda amplificación P2).

Identificación genotípica del RV SA11 por electroforesis de RNA

Para confirmar la identidad del RV SA11, se extrajo el RNA genómico del SA11-P2 y SA11-P3 y se comparó con el RNA genómico del RV SA11-P1 (pase M2 producido por la Dra. Méndez Toss en el Instituto de Biotecnología, UNAM) que sirvió como inóculo para amplificar el virus. A 200 μ L del lisado de células infectadas con RV SA11 se les añadieron 40 μ L de buffer disruptor 5X (Tris 0.05 M pH 6.8, EDTA tetrasódico 0.05 M, NaCl 0.05 M, SDS 5%), 120 μ L de fenol saturado y 120 μ L de cloroformo, y se agitó en vortex por 2 min. Se centrifugó por 5 min a 12,000 rpm, se separó la fase acuosa en un tubo limpio y el resto se desechó. Se tomaron 90 μ L de esta fase acuosa, se colocaron en un tubo limpio, se mezclaron con 10 μ L de azul de bromofenol (0.01 mg/mL en glicerol 50%) y se agitó en vortex. Se analizó la muestra por electroforesis en un gel de poliacrilamida no desnaturalizante al 7.5%, usando buffer de corrida Laemmli 1X sin SDS (Tris base 0.025 M, Glicina 0.192 M, pH 8.3) en cámara Hoefer modelo SE400 y las muestras se corrieron a 90 mA/hora (Total). El gel se colocó en solución fijadora 1X (stock 10X: etanol 99% y 1% de ácido acético) por 30 min, después se colocó en solución con nitrato de plata 1X (stock 100X: AgNO_3 1 M) por otros 30 min, se lavó brevemente dos veces con agua bidestilada, rápidamente se sumergió en solución reveladora (NaOH 0.7 M, formaldehído 0.3%), se mezcló suavemente hasta ver aparecer el patrón de bandas y se detuvo la reacción con ácido acético al 10%.

Extracción del RNA viral del RV SA11

Confirmada la identidad del RV SA11-P3, se realizó la extracción del RNA viral a 90 mL de medio con células infectadas con SA11 (3 frascos F162), se le añadió 1/3 (30 mL) de Freón 11 (Tricloro-trifluorometano Cydsa, Monterrey) para eliminar el virus asociado a membrana, se agitó vigorosamente y se centrifugó a 4,000 rpm durante por 15 min en

rotor JA14 Beckman. Se transfirió la fracción del sobrenadante a tres tubos ultra-clear Beckman de 38 mL, balanceando los tubos con MEM-ss y se ultracentrifugó a 25,000 rpm por 60 min a 4 °C en un rotor SW28. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado con 800 µL totales de agua Mili Q. En un tubo de 1.5 mL limpio se colocaron 400 µL de virus purificado que se adicionaron con 320 µL de agua Mili Q, 20 µL de SDS al 20%, 200 µL de fenol saturado y 200 µL de cloroformo (con el objetivo de romper las capas proteicas del virus), se agitó durante 1 min en vortex y se centrifugó 3 min a 12,000 rpm. Se colectó y midió la fase acuosa, se dividió en dos tubos de 1.5 mL, a cada uno se le agregó 1/10 de volumen de acetato de sodio ($C_2H_3NaO_2$) 3M pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto homogenizando suavemente invirtiendo el tubo, y se dejó precipitar toda la noche a 4 °C. Posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm durante 15 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y se le agregó suavemente 750 µL de etanol al 70% frio al precipitado. Se volvió a centrifugar por 1 min a 14,000 rpm, se decantó y se dejó secar a temperatura ambiente por 15 min para eliminar el excedente de etanol. Por último se resuspendió en 50 µL de agua Mili Q, para obtener un volumen final de 100 µL y se almacenó a -20 °C. De la muestra obtenida se analizaron por electroforesis de ácidos nucleicos en minigel 3 µL más 1/10 de buffer de muestra (BM stock 10X: 50% de glicerol en agua, 0.42% de azul de bromofenol y 0.42% de cianol de xileno FF). Se corrió el gel de agarosa al 1% conteniendo bromuro de etidio (BrEt) a una concentración final de 0.5 mg/mL, durante 1 hr a 80 V en buffer TAE (1X: 40 mM de Tris-acetato y 1 mM de EDTA). Se usaron 5 µL de marcador de 1kb de DNA (Invitrogen®, stock 100 ng/µL) como patrón de bandeo.

Purificación del RNA viral mediante minicolumnas RNeasy® de Qiagen

Para evitar al máximo posibles contaminantes en la muestra de RNAdc se realizó una purificación por columna. A 100 µL de RNAdc se le adicionaron 350 µL del buffer RLT, se mezcló, se añadió 250 µL de etanol absoluto y se mezcló por pipeteo. La muestra se colocó en una mini-columna RNeasy, sobre un tubo de 2 mL, se centrifugó por 15 seg a 10,000 rpm y se retiró el líquido recolectado. Se lavó la columna con 500 µL de buffer RPE, se centrifugó por 15 seg a 10,000 rpm y se desechó el líquido. Se colocaron de nuevo 500 µL de buffer RPE, se centrifugó por 2 min a 14,000 rpm para secar la membrana, y se descartó el líquido. Se transfirió la columna a un tubo limpio de 1.5 mL, se eluyó el RNAdc con 50 µL de agua Mili Q dejando reposar 2 min. Se centrifugó a 10,000 rpm por 1 min y se guardó el eluato a -20 °C. Se analizaron 3 µL de muestra más 1/10 de BM por electroforesis en gel de agarosa al 1% con BrET durante 1 hr a 80 V en buffer TAE 1X. Se usaron 5 µL de marcador de 1 kb de DNA como patrón de bandeo.

Transcripción reversa del segmento 2 de SA11

Se realizó una transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) para obtener el cDNA del segmento 2. Utilizando el sistema de RT-PCR *ThermoScript*® de Invitrogen®. Se usaron los oligonucleótidos que fueron diseñados en base a la secuencia del Genbank No. AF474406 del segmento 2 del RV SA11:

SA11-2: 5'-*gtacatccATGGCGTATCGAAAAC*-3' (24 bases), que contiene la secuencia de restricción 5'-ccatgg-3' para *NcoI* y el codón de inicio ATG (se indican con mayúsculas las bases que corresponden a la secuencia sentido del gene 2 del RV SA11).

SA11PT-2: 5'- *gataactcgag*CAGTTCGTTTCGTTTCATGATG-3' (31 bases), que contiene la secuencia de restricción 5'-ctcgag-3' para *Xho*I, no incluye el codón de paro (se indican con mayúsculas las bases que corresponden a la secuencia antisentido del gene 2 del RV SA11).

El oligonucleótido SA11PT-2 no contiene codón de paro debido a que el vector lo proporciona después de la secuencia que codifica para 6 histidinas en el extremo 3' del sitio de clonación. La proteína recombinante traducida tendrá los 882 aa del segmento completo de VP2 seguidos de un residuo de leucina y de glutamato no presentes en el segmento silvestre, y terminará con 6 histidinas en su extremo carboxilo, estas últimas serán útiles para el procedimiento de purificación.

La reacción con todos los componentes tuvo un volumen final de 10 μ L, conteniendo: 0.5 μ M de cada uno de los oligonucleótidos, 2 μ L del RNAdc, buffer de síntesis cDNA 1X, DTT 5 mM, RNase OUT (2 U/ μ L), dNTPs 1mM, Thermoscript[®] (0.75 U/ μ L). El tubo de reacción se incubó en un termociclador Perkin Elmer[®] modelo 2400 a 94 °C por 3 min, y al descender a 55 °C se agregó la mezcla de Thermoscript[®], permaneciendo a 55 °C por 30 min. La transcriptasa reversa se inactivó a 85 °C por 5 min y se conservó a 4 °C hasta retirar el tubo. El RNA del híbrido DNA/RNA se digirió con 0.5 μ L de RNase H (1.7 U) incubando a 37 °C por 20 min. Se almacenó la muestra a -20 °C.

Amplificación del cDNA del segmento 2 de SA11 por PCR

A partir del cDNA obtenido por RT-PCR, se amplificó el segmento 2 por PCR con la enzima *Platinum Taq Polimerasa* de Invitrogen[®]. La reacción de PCR se hizo en un volumen final de 20 μ L que contenía: buffer de polimerasa 1X, MgCl₂ 1.5mM, dNTPs

0.2mM, 0.2 μ M de cada oligonucleótido, 1U de polimerasa y 1 μ L de cDNA. Se pre-incubó a 94 °C por 1 min 45 seg y se termocicló 25 veces a 94 °C por 15 seg, 56 °C por 30 seg y 68 °C por 2 min 30 seg. Al finalizar los ciclos se mantuvo a 4 °C hasta recuperar el tubo y se almacenó la muestra a -20 °C. De la muestra obtenida se analizaron 2.5 μ L más 1/10 de BM para verificar la integridad del producto de PCR por electroforesis en gel de agarosa al 1% con BrEt. La electroforesis se corrió durante 1 hr a 80 V en Buffer TAE 1X, usando 5 μ L (100 ng/ μ L) de marcador de 1 kb de DNA (Invitrogen®) como patrón de bandeo.

Purificación del producto de PCR por corte de bandas con el Kit QIAquick Gel Extraction de QIAGEN®

Se preparó un gel de agarosa de bajo punto de fusión 1%, donde se corrió el total del producto de PCR más 1/10 de BM por 1 hr a 60 V. Con una navaja limpia se cortó la banda correspondiente al segmento 2 de SA11 (2.6 kb) encima de una lámpara de UV, se pesó la banda de gel, se le adicionaron tres volúmenes de buffer QG y se incubó a 50 °C durante 10 min, mezclando en vortex para ayudar a disolver. Disuelto la banda de gel se añadió un volumen de isopropanol, se mezcló la muestra, se colocó en una columna y se centrifugó por 1 min a 13,000 rpm. Se desechó el flujo recolectado, se reutilizó el tubo recolector, se añadió 0.5 mL de buffer QG a la columna y se centrifugó por 1 min a 13,000 rpm. Se descartó el flujo, se colocó la columna en el mismo tubo colector, se agregó 0.75 mL de buffer PE y se centrifugó a 13,000 rpm por 1 min. Se descartó el líquido colectado y se volvió a centrifugar por 1 min a 13,000 rpm. Se colocó la columna en un tubo limpio de 1.5 mL, se eluyó el DNA adicionando 50 μ L de agua Mili Q, dejando reposar por 1 min. y se centrifugó a 13,000 rpm por 1 min. Se tomaron 2.5 μ L de muestra más 1/10 de BM para analizar la integridad del DNA por electroforesis en gel de agarosa al 1% con BrEt,

durante 1 hr a 80 V en Buffer TAE 1X, usando 5 μ L (100 ng/ μ L) de marcador de 1 kb de DNA (Invitrogen[®]) como patrón de bandeo. Por último se cuantificó el DNA por Nanodrop[®] y se almacenó la muestra a -20°C.

Miniprep de lisis alcalina para verificar la presencia del vector pET28b(+) en bacterias BL21 (DE3)

Se tomaron bacterias BL21 (DE3) transformadas con el vector pET28b(+) y se dejaron crecer en placas con medio selectivo agar-LB (Luria-Bertani)-Kan (Kanamicina: 50 μ g/mL) por 24 hrs a 37 °C. Se escogieron colonias aisladas para inocular 5 ml de medio selectivo líquido LB-Kan (50 μ g/mL) por separado y se dejaron crecer a 37 °C por 8 hrs a 250 rpm. Se colocaron 1.5 mL de medio en tubos de microcentrifuga de 1.5 mL, se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min y se desechó el sobrenadante. Se resuspendió el pellet con 100 μ L de buffer GTE (50 mM de glucosa; 25 mM de Tris-HCl pH 8; 10 mM de EDTA pH 8) con RNasa A (500 μ g/mL concentración final) por 5 min a temperatura ambiente. Se adicionó 200 μ L de la solución de lisis NaOH/SDS (0.2 N NaOH, 1% SDS), se mezcló por inversión con la mano e incubó por 5 min en hielo. Se le añadió 150 μ L de acetato de potasio 5M pH 4.8, se aplicó rápidamente vortex a máxima velocidad por 15 seg, se incubó en hielo por 5 min y se centrifugó por 7 min a 14,000 rpm. Se transfirió el sobrenadante a un tubo de 1.5 mL limpio, se agregaron 0.8 mL de etanol al 95%, se mantuvo por 2 min a temperatura ambiente, se centrifugó por 2 min a 14,000 rpm y se desechó el sobrenadante. Se lavó el pellet con 1 mL de etanol al 70% y se centrifugó por 2 min a 14,000 rpm, este paso se repitió dos veces. Se dejó secar el pellet por 5 min a temperatura ambiente y otros 5 min a 37 °C, y se resuspendió el pellet con 30 μ L de agua Mili Q. Se linealizó el plásmido pET28b(+) con una reacción de digestión con un volumen final de 20 μ L y que contenían: Buffer 1X (Buffer React2), enzima de restricción 10 U

(*Xho*I) y 10 μ L de la muestra de miniprep. De la reacción de digestión y de la miniprep se tomaron 10 μ L de cada una, mas 1/10 de BM. Se corrieron los productos de digestión y los no digeridos por electroforesis en gel de agarosa al 1% con BrEt, durante 1 hr a 80 V en buffer TAE 1X, usando 5 μ L de marcador superenrollado de DNA (Promega[®]) y 5 μ L de marcador de 1 kb de DNA (Invitrogen[®]) como patrones de bandeo.

Producción y purificación del vector pET28b(+) con el kit Plasmid Maxi de QIAGEN[®]

Se eligió sólo una clona positiva para inocular 100 mL de medio líquido selectivo LB- Kan (50 μ g/mL), se dejó crecer a 37 °C por 16 hrs a 250 rpm. Se cosecharon las bacterias por centrifugación a 6,253 rpm por 15 min a 4 °C con un rotor JA14 Beckman y se desechó el sobrenadante. Se resuspendió el pellet con 10 mL de buffer P1, se añadió 10 mL de buffer P2, se mezcló suavemente y se incubó por 5 min a temperatura ambiente. Se agregó 10 mL de buffer P3 frío, se mezcló inmediatamente, se incubó en hielo por 20 min y se centrifugó a 11,400 rpm por 30 min a 4 °C. Se removió el sobrenadante a un tubo limpio y se volvió a centrifugar a 4 °C por 15 min a 11,400 rpm. El sobrenadante fue aplicado a una columna QIAGEN-tip 500 pre-equilibrada con 10 mL de buffer QBT y se lavó la columna dos veces con 30 mL de buffer QC. Para eluir el plásmido se aplicó a la columna 15 mL de buffer QF, y al volumen colectado se le agregaron 0.7 volúmenes de isopropanol a temperatura ambiente para precipitar el DNA y se centrifugó a 4 °C por 30 min a 12,000 rpm en un rotor JA20 Beckman. Se desechó el sobrenadante cuidadosamente y se lavó el pellet con 5 mL de etanol al 70% a temperatura ambiente y se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min a 4 °C. Se descartó el etanol, se dejó secar el pellet a temperatura ambiente por 5-10 min, se resuspendió con 500 μ L de agua Mili Q y se almacenó a -20 °C. Se tomaron 10 μ L de la muestra más 1/10 de BM para verificar la integridad del vector pET28b(+) por electroforesis en gel de agarosa al 1% con BrEt,

durante 1 hr a 80 V en buffer TAE 1X, usando 5 µL de marcador superenrollado de DNA (Promega®) como patrón de bandeo y se cuantificó por Nanodrop®.

Sistema de expresión pET-28b(+)

pET28b(+) es un vector desarrollado por Novagen® para la expresión regulada de genes en células procariotas dependiente de la RNA polimerasa del bacteriófago T7. El vector contiene un sitio múltiple de restricción que permite clonar el gene de interés. Este vector contiene al marcador de selección que expresa la kanamicin-fosfotransferasa que confiere resistencia al antibiótico Kanamicina, y un gene regulador que expresa al represor del operón lactosa *lacI* que bloquea la transcripción del gene blanco en ausencia de inductor. Para la producción de la proteína, el plásmido recombinante es transferido a una cepa de *E. coli* que contenga una copia cromosomal del gene de la RNA polimerasa T7. La expresión de la RNA polimerasa T7 es inducible agregando al medio de cultivo isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido (IPTG), éste es un análogo no metabolizable de la lactosa, que se une al represor inactivándolo. La polimerasa expresada reconoce específicamente a su promotor, transcribiendo al gene de interés insertando en el plásmido.

Reacción de digestión con *XhoI* del segmento 2 y del vector pET28b(+)

La reacción de digestión se realizó con un volumen final de 50 µL que contenía: buffer REact2 1X (Invitrogen®), *XhoI* 10 U (Invitrogen®) y por último cDNA 1.5 µg o pET28b+ 5 µg. Se incubó la reacción a 37 °C por 16 hrs.

Purificación de los productos de restricción: segmento SA11-2/*Xho*I y pET28b(+)/*Xho*I

Se realizó la purificación de los productos de digestión para retirar los reactivos y la enzima, ya sea por el sistema QIAquick PCR purification o QIAquick Gel extraction, ambos de QIAGEN®.

Purificación del producto de restricción segmento SA11-2/*Xho*I por el Kit QIAquick PCR purification de QIAGEN®: A los 50 µl de la reacción de digestión se le agregaron 5 volúmenes de buffer PBI, se colocó la muestra en una columna QIAquick con un tubo recolector y se centrifugó a 14,000 rpm por 1 min. Se descartó el flujo, se lavó la muestra con 0.75 mL de buffer PE y se centrifugó a 13,000 rpm por 1 min. Se desechó el flujo y se centrifugó por 1 min a 13,000 rpm. Se colocó la columna en un tubo de 1.5 ml limpio, se agregaron 40 µL de agua Mili Q en la membrana, se dejó reposar por 1 min y se centrifugó a 13,000 rpm por 1 min. La muestra se almacenó a 4°C.

Purificación del producto de la reacción restricción pET28b(+)/*Xho*I por el Kit QIAquick Gel Extraction®: Se realizó la purificación de pET28b(+)/*Xho*I con este kit (protocolo mencionado previamente) para separar los plásmidos digeridos de los no digeridos.

Para analizar la integridad de los productos, se tomaron 2 µL de cada muestra más 1/10 de BM, se corrieron en un gel de agarosa al 1% con BrEt, durante 1 hr a 80 V en buffer TAE 1X, se usaron 5 µL de marcador superenrollado de DNA (Promega®) y de 1 kb lineal de DNA (Invitrogen®) como patrón de bandeo.

Digestión con *NcoI* del segmento SA11-2/*XhoI* y del vector pET28b(+)/*XhoI*

La reacción de digestión se realizó con un volumen final de 50 µL que contenía: buffer 4 1X (New England Biolabs®), *NcoI* 10 U (New England Biolabs®) y por último cDNA (1.4 µg aproximadamente) o pET28b(+) (4 µg aproximadamente). Se dejó la reacción a 37 °C por 16 hrs.

Purificación de los productos de restricción: *NcoI*/segmento SA11-2/*XhoI* y *NcoI*/pET28b(+)/*XhoI*

Se realizó la purificación de los productos de digestión para retirar los reactivos y la enzima. Para purificar el producto *NcoI*/segmento SA11-2/*XhoI* se empleó el Kit QIAquick PCR purification de QIAGEN® siguiendo el mismo protocolo anterior de la purificación para el segmento SA11-2/*XhoI*. La purificación de *NcoI*/pET28b(+)/*XhoI* se realizó con el Kit QIAquick Gel Extraction QIAGEN® aplicando el protocolo antes mencionado. Se tomaron 5 µL de cada muestra más 1/10 de BM para verificar la integridad de los productos por electroforesis en gel de agarosa al 1% con BrEt, durante 1 hr a 80 V en buffer TAE 1X, usando 5 µL de marcador 1 kb lineal de DNA (Invitrogen®) y de marcador superenrollado de DNA (Promega®) como patrón de bandeo y se cuantificó por Nanodrop®.

Desfosforilación del vector pET28b(+) lineal

Del plásmido linealizado se tomó 1 pmol de extremos 5' de DNA (1.743 µg). Se realizó la reacción de desfosforilación en un volumen final de 50 µL que contenía: buffer CIAP 1X (Invitrogen®), enzima CIAP 0.01 U (Invitrogen®) y pET28b(+) linealizado 1 pmol de extremos 5', y se dejó la reacción por 1 hr a 37 °C. Después se realizó la extracción de la enzima CIAP, se agregó 1 volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) a la

reacción, se aplicó vortex y se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min. Se tomó la parte acuosa superior y se aplicó a un tubo limpio. Para purificar el plásmido lineal desfosforilado se utilizó el QIAquick PCR purification de QIAGEN® aplicando el mismo protocolo que se mencionó anteriormente. Se cuantificó por Nanodrop®.

Ligación de los productos de restricción *NcoI*/segmento SA11-2/*XhoI* y *NcoI*/pET28b(+)/*XhoI*

La reacción de ligación se realizó con una relación molar de 5:1 (inserto:vector). El volumen final de la reacción fue de 20 μ L el cual contenía: buffer ligasa 1X (Invitrogen®), enzima T4 DNA ligasa 5 U (Invitrogen®), *NcoI*/segmento SA11-2/*XhoI* 6.41 μ L (133 ng) y *NcoI*/pET28b(+)/*XhoI* 2.64 μ L (52.3 ng). Se incubó la reacción de ligación por 22 hrs a 14 °C.

Producción de bacterias XL-Blue electrocompetentes

Se produjeron bacterias *E. coli* XL-Blue electrocompetentes, es decir preparadas para ser transformadas por electroporación. Se descongelaron bacterias XL-Blue y se dejaron crecer en placas con medio agar-LB por 24 hrs a 37 °C. Se tomó una colonia aislada para inocular 5 mL de medio líquido LB y se dejó crecer toda la noche a 250 rpm hasta saturación a 37 °C. Se tomaron 3 mL del medio para inocular 250 mL de medio LB y se dejó crecer a 37 °C a 250 rpm hasta obtener una DO_{600} entre 0.45 y 0.55. Se colocó el medio en botellas de centrifuga de 250 mL estériles y fríos, y se mantuvieron en hielo por 10 min. Se centrifugó a 4 °C por 15 min a 5100 rpm en un rotor JA14 Beckman, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 250 mL de agua estéril. Se centrifugó a 4 °C por 15 min a 5100 rpm, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 125 mL de agua estéril. Se volvió centrifugar a 4 °C por 15 min a 5100 rpm, se

desechó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 5 mL de glicerol al 10% estéril previamente enfriado. Se colocó la muestra en tubo de centrifuga de 50 mL estéril y frío, y se centrifugó a 5750 rpm por 15 min a 4 °C en un rotor JA20 Beckman. Se descartó el sobrenadante, se resuspendió el pellet con 1 mL de glicerol al 10% estéril y frío, y se hicieron alícuotas de 50 µL de la suspensión bacteriana en tubos de 1.5 mL estériles preenfriados, Es importante recalcar la importancia de mantener a 4 °C en forma estricta todos los pasos que así lo indican, ya que de eso dependerá la competencia de las bacterias.

Electroporación de bacterias XL-Blue

Para realizar la transformación, de la reacción de ligación se tomaron solo 15 ng de DNA, se mezclaron suavemente con 50 µL de bacterias XL-blue electrocompetentes y se incubó por 1 min en hielo. La mezcla fue colocada en celdas de electroporación de 0.2 cm previamente enfriadas, se aplicó un pulso eléctrico de 2.5 kV (MicroPulser™ modelo 165-2100 de BIO-RAD) e inmediatamente se colocó 1 mL de medio SOC preincubado a 37 °C. Se transfirió la muestra a un tubo de 1.5 mL estéril y se incubó a 37 °C con agitación suave (250 rpm) durante 1 hr. Posteriormente se centrifugó a 5,000 rpm por 5 min, se descartó el sobrenadante, se resuspendió con 100 µL de medio LB o SOC, los cuales fueron colocados en cajas de medio selectivo agar-LB-Kan (50 µg/ml) y se incubaron por 24 hrs a 37 °C.

Miniprep del vector recombinante pET28b-SA11-2 en bacterias XL-Blue por el kit QIAprep Spin Miniprep de QIAGEN®

Se tomaron las colonias de interés que fueron inoculadas en 5 mL de medio selectivo líquido LB-Kan (50 µg/mL) por separado y se incubaron a 37 °C por 12 hrs a 250 rpm. Se

utilizó el kit QIAprep Spin Miniprep de QIAGEN® para aislar el plásmido recombinante. Se colocaron 1.5 mL de cultivo en tubos Eppendorf de 1.5 mL limpios y se centrifugó por 5 min a 5,000 rpm. Se retiró el sobrenadante, se resuspendió el pellet con 250 µL de buffer P1, se añadieron 250 µL de buffer P2, y se pipeteó suavemente. Posteriormente se agregaron 350 µL de buffer N3, se mezcló y se centrifugó por 10 min a 13,000 rpm. El sobrenadante fue aplicado a una columna QIAprep Spin y de nuevo se centrifugó a 13,000 rpm por 1 min. Se descartó el flujo del tubo colector, se lavó la columna con 0.5 mL de buffer PB y se centrifugó por 1 min a 13,000 rpm. Nuevamente se retiró el flujo, se lavó la columna con 0.75 ml de buffer PE y se centrifugó por 1 min a 13,000 rpm. Se desechó el flujo y se centrifugó por 1 min a la misma velocidad. Se colocó la columna en un tubo de 1.5 mL, se añadió a la membrana 50 µL de agua Mili Q para eluir el DNA, se dejó reposar por 1 min y centrifugó a 13,000 rpm por 1 min. Se almacenó la muestra a -20 °C.

Análisis del plásmido recombinante pET28b-SA11-2

Se utilizó la muestra de la miniprep para reacciones de digestión con las enzimas *XhoI* (Invitrogen) y *NcoI* (New England Biolabs). Se linealizó el plásmido recombinante pET28b-SA11-2 con dos reacciones de digestión que tuvieron un volumen final de 20 µL y que contenían: Buffer 1X (Buffer React2 o Buffer 4), enzima de restricción 10U (*XhoI* o *NcoI*) y 10 µL de la muestra de miniprep. Para verificar la presencia del inserto se realizó una doble digestión con las mismas enzimas, el volumen final de la reacción fue de 20 µL que contenían: buffer React2 1X, enzimas *XhoI* 10 U y *NcoI* 10 U, y 10 µL de la muestra de miniprep. Se analizaron los productos de la reacción de digestión y del miniprep en un gel de agarosa al 1% con BrEt en TAE 1X a 70 V por 1 hr, se usaron 5 µL de marcador

superenrollado de DNA (Promega®) y de 1 kb lineal de DNA (Invitrogen®) como patrón de bandeó.

Producción de bacterias BL21 (DE3) y BL21 (DE3) pPRIL competentes por RbCl para transformación por choque-térmico

Se produjeron bacterias BL21 (DE3) y BL21 (DE3) pPRIL competentes, de acuerdo al siguiente procedimiento. Se tomaron bacterias del congelador y transportaron en hielo. Se estriaron células BL21 (DE3) en una placa de medio LB s/antibiótico y BL21 (DE3) pPRIL en una placa de medio LB-Cloranfenicol (LB-Clo 100 µg/mL) para obtener colonias aisladas. Se dejaron toda la noche a 37 °C. Se creció una de las colonias aisladas en 5 mL de medio líquido LB s/antibiótico o LB-Clo (100 µg/mL) por toda la noche a 37 °C y 225 rpm. Se transfirió 1 mL del precultivo saturado a 50 mL de LB s/antibiótico o LB-Clo (100 µg/mL). Se incubaron en un matraz de 500 mL a 37 °C y 225 rpm. Se detuvo el cultivo a una $DO_{600} = 0.5 - 0.6$. Se centrifugaron las células a 2500 rpm. por 10 min a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y resuspendió el pellet suavemente en 20 mL de TfbI frío con pH de 5.8 ($C_2H_3O_2K$ 30 mM, $MnCl_2$ 50 mM, RbCl 100 mM, $CaCl_2$ 10 mM, glicerol 12 %) por cada 50 mL de cultivo inicial y se mantuvo en hielo por 2 hrs, con agitación suave. Se centrifugaron las células a 2500 rpm por 10 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet suavemente en 2 mL de TfbII frío (MOPS pH 7 10 mM, $CaCl_2$ 75 mM, RbCl 10 mM, glicerol 12%) por cada 50 mL de cultivo inicial. Se incubó en hielo por 1 hr, con agitación suave. Se realizaron alícuotas de 100 µL en tubos Eppendorf de 1.5 mL fríos. Se congelaron inmediatamente utilizando un baño de hielo seco etanol y se guardaron a -70 °C.

Transformación de bacterias BL21 (DE3) y BL21 (DE3) pPRIL por choque térmico

Se tomaron 5 μ L de la miniprep de pET28b-SA11-2, se mezclaron con 50 μ L de células BL21 (DE3) o BL21 (DE3) pPRIL competentes (previamente tratadas con RbCl), se incubó por 30 min en hielo y se transformaron mediante choque-térmico a 42 °C por 1 min. Después de la transformación las bacterias se dejaron crecer por 1 hr en 1 mL medio SOC a 250 rpm. Se realizó el sembrado en placas con medio selectivo agar-LB-Kan (50 μ g/mL) para la cepa BL21 (DE3) y en medio selectivo agar-LB-Kan-Clo (50-100 μ g/mL) para la cepa BL21 (DE3) pPRIL y se incubaron por 24 hrs a 37 °C. Se tomaron las clonas positivas para realizar una miniprep de lisis alcalina (protocolo explicado anteriormente) para extraer el plásmido recombinante. Solo el plásmido de la cepa BL21 (DE3) se analizó con reacciones de digestión con las enzimas *Xho*I y *Nco*I (protocolos que se utilizaron para el análisis del plásmido recombinante de las bacterias XL-Blue). Se verificó la presencia del vector recombinante o la del inserto en un gel de agarosa al 1% con BrEt en TAE1X a 70 V por 1 hr, se usaron 5 μ L de marcador superenrollado de DNA (Promega®) y de 1 kb lineal de DNA (Invitrogen®) como patrón de bandeo y se cuantificó por Nanodrop®.

Expresión en bacterias transformadas con el plásmido recombinante pET28b-SA11-

2

Se eligió una clona positiva de cada cepa bacteriana con el plásmido recombinante pET28b-SA11-2 para inocular 5 mL de medio selectivo líquido LB-Kan (50 μ g/mL) o LB-Kan-Clo (50-100 μ g/mL) y se dejó crecer a 37 °C con agitación (250 rpm) toda la noche. Se tomaron 0.5 mL del precultivo para inocular 50 mL de medio selectivo líquido LB-Kan (50 μ g/mL) o LB-Kan-Clo (50-100 μ g/mL) según la cepa correspondiente, se dejaron crecer los medios a 37 °C con agitación moderada (250 rpm); alternativamente se midió la DO_{600nm} hasta llegar a 0.50 abs., en este punto se procedió a realizar la inducción con

IPTG con una concentración final de 1mM (a los controles negativos no se les agrega IPTG) y se incubó por 3 hrs a 37 °C. Los medios se pusieron en botellas de centrifuga de 250 mL estériles previamente enfriados, se incubaron en hielo por 5 min y se centrifugaron a 5700 rpm a 4 °C por 5 min en un rotor JA14 Beckman. Se resuspendió cada pellet en 0.25 del volumen de cultivo utilizando 12.5 mL Tris-HCl 20 mM pH 8.0 frío. En este paso se colocaron alícuotas de 1mL de cada cultivo en tubos de 1.5 mL con tres repeticiones; se centrifugaron a 6,000 rpm por 5 min a 4 °C y se almacenaron los pellets a -70 °C. Alternativamente, se centrifugó a 6430 rpm por 5 min a 4°C y se almacenó el pellet a -70 °C. De esta manera se contó con tres alícuotas pequeñas para análisis y el resto del material procedente de 50 mL de cultivo original en una muestra mayor.

Detección de la proteína rVP2 en un gel de poliacrilamida al 7.5%

Para verificar que las bacterias expresaron la proteína de interés se llevó a cabo una lisis bacteriana. Se descongeló el pellet de la muestra de 1mL sobre hielo, se resuspendió con 500 µL de buffer de sonicado (Complete EDTA-Free® de Roche® stock 75 µL; PBS A 1X 425 µL), se sonicó la muestra sobre hielo por pulsos 15 seg por 10 ciclos a 60° de amplitud y se dejó reposar por 30 seg entre ciclos (Sonicador Modelo: Vibra-cell VC 130 PB). Se tomaron 2 alícuotas de 20 µL del sonicado total (proteínas totales), posteriormente se centrifugó a 11,000 rpm por 20 min a 4 °C y se extrajeron dos alícuotas de 20 µL del sobrenadante (proteínas solubles). El pellet fue resuspendió con 50 µL de BS y se tomaron dos alícuotas de 10 µL (proteínas insolubles). Las muestras se cuantificaron por el método de Bradford y se corrieron 20 µg de proteínas de cada alícuota (proteínas totales, solubles e insolubles) de ambas cepas bacterianas y se corrieron en un gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS) al 7.5% a 170 mA/tiempo total, usando buffer de corrida Laemmli 1X. La tinción del gel de poliacrilamida se realizó con azul de

Coomassie, por lo que primero se colocó el gel con solución fijadora (SF: metanol 50%, ácido acético 10% y agua destilada 40%) por 30 min en agitación suave. Se retiró la SF y se añadió la solución de azul de Coomassie (SAC: metanol 50%, azul de Coomassie R-250 0.1%, ácido acético 10% y agua destilada 40%) por 2 hrs en agitación. Se desechó la solución SAC, se lavó el gel con SF y se agregó la solución para desteñir (metanol 5%, ácido acético 7% y agua destilada 88%) con agitación, se dejó hasta visualizar las bandas azules y se analizó.

Detección de la proteína rVP2 y VP2 por Western blot

Se detectó la proteína rVP2 usando el AMC 6E8/3A8 de ratón contra VP2. Las muestras fueron donadas por el Dr. Carlos Guerrero, quien sembró e infectó células BSC-1 con RV SA11 y RRV (protocolo anteriormente mencionado), las cosechó 12 hrs post-infección en tubos de 1.5 mL, sónico las muestras para provocar una lisis celular y las almacenó a -20 °C. Se corrieron 10 µg de proteínas insolubles de ambas cepas bacterianas como de proteínas totales de las células control infectadas y 100 µL de virus RRV ultracentrifugado en un gel de 3 mm de ancho de poliacrilamida desnaturizante (SDS) al 7.5%, a 170 mA/hr (total), usando buffer de corrida Laemmli 1X. Una vez separadas las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa en buffer de transferencia (BT: Tris 25mM, glicina 192mM, 20% de metanol y SDS 0.1%). La membrana fue previamente equilibrada con agua estéril durante 10 min. La transferencia se hizo a 180mA durante 1 hr en una cámara semi-seca. La membrana se lavó con TBS por 5 min (Tris-HCl 20mM pH 7.5, NaCl 0.5M), se bloqueó con TTBS (Tris-HCl 20mM pH 7.5, NaCl 0.5M, X-Tween 0.05%) más 5% de leche por 1 hr a temperatura ambiente en agitación suave. A la membrana se le colocó el AMC3A8 a una dilución de 1:5,000 con TTBS más 1% de leche y se incubó toda la noche a 4 °C con agitación constante. Se lavó la membrana 3 veces

con TTBS por 5 min y se colocó el anti-IgG de ratón peroxidado, se dejó en agitación constante por 2 hrs y se lavó la membrana 3 veces con TTBS por 5 min. Se detectaron las bandas de la membrana con el kit Super West Femto Maximum Sensitivity Substrate[®] (Pierce[®]), se colocó la película sobre la membrana, se reveló y con ayuda del marcador de peso molecular pre-teñido fue identificado el peso molecular aproximado de la proteína recombinante viral de interés.

Secuenciación del segmento 2 del RV SA11

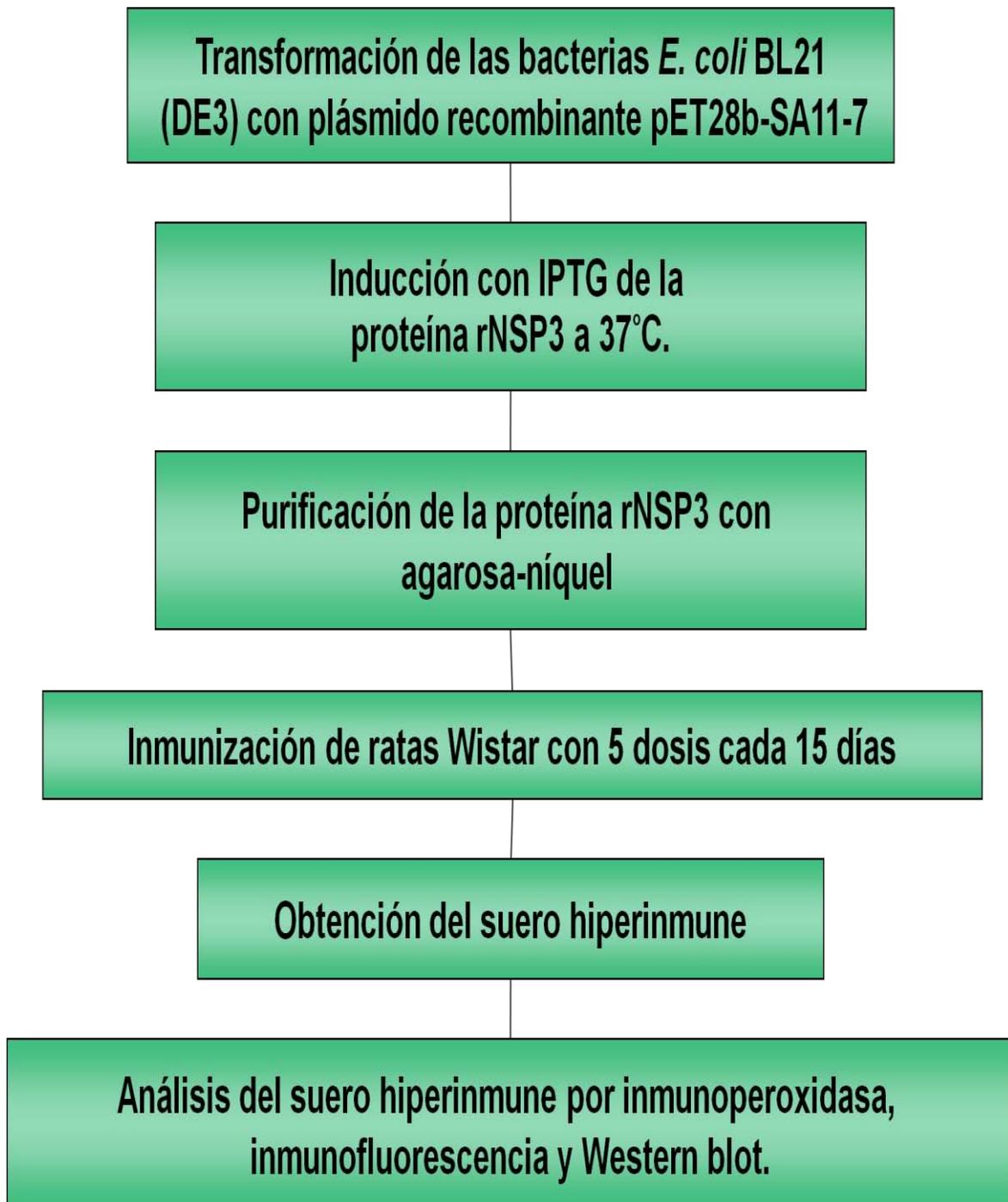
Basándonos en la secuencia del Genbank No. AF474406, se diseñaron oligonucleótidos para secuenciar el segmento 2 del RV SA11. Se secuenciaron las cadenas sentido y la antisentido para tener una mayor confiabilidad. El diseño de los oligonucleótidos se muestra en la Tabla 2. Posteriormente se realizó el análisis de la secuencia con los programas DNAMAN[®], CLC Main Workbench version 5.6[®] y BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

Tabla 2. Diseño de los oligonucleótidos para secuenciar el segmento 2 clonado.

Se muestran los oligonucleótidos usados para secuenciar el segmentos 2 del RV SA11 y algunas características de estos.

Nombre	Oligonucleótido	Bases	Posición	Tm °C	Observaciones
Oligonucleótidos para la secuencia sentido					
PT7F	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'	20	Promotor T7	47.1	Este oligo se une a la secuencia complementaria del promotor T7 del vector pET28b(+)
SAF21	5'-GAGATACTCTTCCTGATGG-3'	19	477-496	49.2	
SAF22	5'-GATCTGTGGTGCCAGAC-3'	17	1008-1024	52.5	
SAF23	5'-CTAGACAACAGTTTCCCAC-3'	19	1560-1578	50.3	
SAF24	5'-CAGATTGAACGTGCATC-3'	17	2090-2106	51.0	
Oligonucleótidos para la secuencia antisentido					
SAR24	5'-CGGCATTTCCATTAATAC-3'	18	540-557	51.5	
SAR23	5'-CTGTTAAGAACTGAGTCTCTG-3'	21	1104-1124	49.2	
SAR22	5'-CGACAAGCTGACCAAG-3'	16	1635-1650	51.2	
SAR21	5'-CCGTCCAAGTTTCTGG-3'	16	2189-2204	52.9	
TT7R	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'	19	Terminador T7	56.3	Este oligo se une al terminador T7 del vector pET28b(+)

Diseño experimental para la proteína NSP3



Antecedentes experimentales: Experimentos para la expresión, purificación y producción del suero hiperinmune contra la proteína NSP3 (segmento 7) del RV SA11. Se usó el plásmido pET28b-SA11-7 previamente producido por la estudiante de la Licenciatura de Investigaciones Biomédicas Básica, UNAM, Maritrini Colon González durante su estancia en el laboratorio.

Miniprep de lisis alcalina para verificar la presencia del vector recombinante pET28b-SA11-7 en bacterias BL21-(DE3)

Para confirmar la presencia del plásmido se realizó una miniprep de lisis alcalina (protocolo mencionado anteriormente) para extraer al vector recombinante pET28b-SA11-7 de las bacterias BL21-(DE3) transformadas con este plásmido. Se utilizó la muestra de la miniprep para una reacción de digestión con la enzima *Bgl II* (Fermentas®). Se linealizó el plásmido recombinante pET28b-SA11-7 con un volumen final de 20 µL y que contenían: Buffer O 1X, enzima de restricción 10 U y 10 µL de la muestra de miniprep. Se tomaron 10 µL de la reacción de digestión y 3 de la miniprep, a cada una se les agregó 1/10 de BM para verificar la presencia del vector pET28b-SA11-7 por electroforesis en gel de agarosa al 1% con BrEt, durante 1 hr a 80 V en buffer TAE 1X100, usando 5 µL de marcador superenrollado de DNA (Promega®) y 5 µL de marcador 1 kb lineal de DNA (Invitrogen®) como patrones de bandeo.

Inducción del plásmido recombinante pET28b-SA11-7

Se eligió una clona positiva con el plásmido recombinante pET28b-SA11-7 para inocular 5 mL de medio selectivo líquido LB-Kan (50 µg/mL) y se dejó crecer a 37 °C con agitación (250 rpm) toda la noche. Se tomó 0.5 mL del precultivo para inocular 50 mL de medio selectivo líquido LB-Kan (50 µg/mL) dejando crecer el medio a 37 °C a 250 rpm (se

sembraron 500 mL de cultivo); alternativamente se midió la DO_{600nm} hasta llegar a 0.50 abs., a este punto se procedió a realizar la inducción con IPTG con una concentración final de 1 mM (a los controles negativos no se les agrega IPTG) y se incubó por 5 hrs a 37 °C. Los medios se pusieron en tubos de centrifuga de 250 mL estériles previamente enfriados, se incubaron en hielo por 5 min y se centrifugaron a 5,700 rpm a 4 °C por 5 min en un rotor JA14 Beckman. Se resuspendió cada pellet en 0.25 volumen de cultivo utilizando 12.5 mL Tris-HCL 20 mM pH 8.0 frío, se colocaron alícuotas de 1 mL de cada cultivo en tubos de 1.5 mL (12 tubos por cultivo); se centrifugaron a 6,000 rpm por 5 min a 4 °C y se almacenaron los pellets a -70 °C.

Para verificar que las bacterias expresaron la proteína en estudio, se llevó a cabo una lisis bacteriana con un sonicador. Se descongeló el pellet de una muestra de 1 mL sobre hielo, se resuspendió con 500 µL de buffer de sonicado (BS: Complete EDTA-Free[®] stock 15%, PBS A 1X 85%), se sonicó el tubo sobre hielo por 15 seg con 60 de amplitud por 10 ciclos y se dejó reposar por 30 seg entre ciclos. Se tomó una alícuota de 20 µL del sonicado total (proteínas totales), posteriormente se centrifugó a 11,000 rpm por 20 min a 4 °C y se extrajo otra alícuota de 20 µL del sobrenadante (proteínas solubles). El pellet se resuspendió con 50 µL de BS y se tomó una alícuota de 10 µL (proteínas insolubles). Las muestras se corrieron en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 12.5% a 170 mA/tiempo total, usando buffer de corrida Laemmli 1X.

Purificación de la proteína recombinante NSP3

Como la proteína recombinante NSP3 presenta una cola de histidinas en su extremo carboxilo, la cual fue agregada por el vector, su purificación se realizó por cromatografía de afinidad de agarosa-níquel. Al presentar una cola de histidinas, ésta se adhiere al

níquel y de esta forma facilita su purificación. Durante todo el procedimiento de purificación se trabajó sobre hielo. Se descongelaron 10 pellets sobre hielo y se resuspendieron en 500 μ L de BS cada uno. Se sonicó cada tubo por 10 seg con 60 de amplitud por 10 ciclos, entre ciclos se dejó reposar 30 seg. Se juntaron las muestras en un tubo de centrifuga de 50 mL estéril y previamente enfriado, y se centrifugaron a 9,090 rpm por 30 min a 4 °C en un rotor JA20 Beckman. El sobrenadante se almacenó a -70 °C, el pellet se resuspendió con 10 mL de buffer A (8 M urea, 0.1 M NaH_2PO_4 , 0.01 M Tris-HCl pH 8) previamente se le había añadido imidazol 5 mM y 0.75 mL de Complete EDTA-Free stock. Se incubó a 4 °C por 14 hrs y se centrifugó a 9,090 rpm por 30 min a 4 °C. Se colectó el sobrenadante y se le agrego 500 μ L de Complete EDTA-Free stock. En un tubo Falcon de 15 mL estéril se agregó el sobrenadante (10 mL) y 2.5 mL de resina Ni-NTA 50% (4:1), previamente la resina se incubó con buffer B (8 M urea, 0.1 M NaH_2PO_4 , 0.01 M Tris-HCl pH 6.5) que también contenía imidazol 20 mM por 1 hr en agitación constante a temperatura ambiente, la mezcla se centrifugó a 5,000 rpm por 15 min a temperatura ambiente. Se retiró el sobrenadante, se lavó la resina 2 veces con 10 mL de buffer B más imidazol 5 mM, mezclando la suspensión invirtiendo el tubo por 5 min a temperatura ambiente y centrifugando por 5 min a 5,000 rpm. Se eluyó la proteína recombinante 3 veces con 2 mL de buffer C (8M urea. 0.1M NaH_2PO_4 , 0.01M Tris-HCl, 400 mM Imidazol, pH 8), para hacer cada elusión se mezcló la muestra por 5 min invirtiendo el tubo a temperatura ambiente, se centrifugó a 5,000 rpm por 5 min y se recuperó el sobrenadante. Se puso a dializar los 6 mL de sobrenadante contra 1.2 L de buffer de diálisis (BD: 50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl) toda la noche a 4 °C. Se retiró el buffer y se colocó 1.2 L de BD fresco, a las 3 hrs se volvió a repetir el cambio. La proteína recombinante dializada se concentró por tubos Amicon Ultra 4 (Milipore®) filtrando el sobrenadante por centrifugación a 4,760 rpm a 4 °C, hasta obtener 1 mL de volumen final.

Se corrieron diferentes cantidades de la muestra, así como concentraciones conocidas de albúmina para poder cuantificar la proteína purificada en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 12.5% que se tiñó con azul de Coomassie (protocolo anteriormente mencionado).

Inmunización de ratas y obtención del suero hiperinmune anti-NSP3 (α -NSP3)

Dos ratas fueron previamente sangradas por vía periórbital para obtener el suero preinmune y luego fueron inmunizadas con 200 μ g/dosis de proteína rNSP3 vía intraperitoneal cada 15 días. Se aplicó una primera dosis con adyuvante de Freund's completo (1:1) y cuatro refuerzos con adyuvante de Freund's incompleto (1:1). Se sangró a blanco a los animales 15 días después del último refuerzo, obteniendo la sangre de la vena cava inferior; este procedimiento y el pre-sangrado se realizó con la ayuda de la M. V. Z. Georgina Díaz Herrera adscrita al Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM). Se dejó la muestra de sangre a 37 °C por 2 hrs y luego a 4 °C por 12-16 hrs. Se centrifugó la muestra a 5,000 rpm por 20 min a 4 °C, la muestra se separó en dos fases, se tomó la fase superior que corresponde al suero hiperinmune α -NSP3 y se almacenó a -20 °C. Se obtuvieron los sueros de la 4° y 5° inmunización, así como el suero preinmune para analizar que los animales tuvieran anticuerpos contra RV.

Titulación del suero hiperinmune α -NSP3 por Inmunoperoxidasa

Se obtuvo el título del suero hiperinmune por la técnica de inmunoperoxidasa. Para este fin se sembraron 1×10^4 células MA104 por pozo con MEM-7 en placas de 96 pozos y se incubaron por 4 días a 37 °C con una atmósfera de CO₂ 5%. Se extrajo el medio, se lavaron 2 veces las células con 200 μ L de MEM-ss, se infectaron las células con RV SA11 activado con tripsina (protocolo mencionado anteriormente) con una multiplicidad de

infección (M.O.I) de 0.8 y se dejó la infección por 12-16 hrs a 37 °C con una atmósfera de CO₂ 5%. Se lavaron las células con 200 µL PBS A 1X, se añadió lentamente 200 µL de metanol frío a cada pozo de células infectadas, se retiró la mitad de metanol y se volvieron a añadir 200 µL de metanol frío y se almacenó la placa sellada con Parafilm a -20 °C por al menos 24 hrs. En una placa de 96 pozos con células infectadas y fijadas, se colocaron los sueros α-NSP3 en diferentes diluciones (1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1,600, 1:3,200, 1:6,400, 1:12,800, 1:25,600, 1:51,200 y 1:102,400) preparadas previamente en una placa de 96 pozos limpia, y se dejó incubar por 24 hrs a 4 °C. Se lavó la placa 2 veces con 200 µL PBS A 1X y se colocó α-IgG de rata biotilado (Zymed®) a una dilución de 1:3200 por 2 hrs incubando a temperatura ambiente. Se realizaron dos lavados con 200 µL de PBS A 1X y se colocó la avidina-peroxidasa (Sigma®) a una dilución de 1:3200 (stock 1mg/mL) por 2 hrs. incubando a temperatura ambiente. Se lavó la placa 2 veces con 200 µL de PBS 1X y se añadió 75 µL de sustrato (6.75 mL de buffer de acetato 0.05M pH 5, 1.5 mL 3-amino 9 etil carbazol, 37.5 µL de H₂O₂) y se incubó por 15 min a temperatura ambiente. Se lavó la placa 3 veces con agua destilada, se dejó secar para ser observado en el microscopio óptico y se realizó la titulación del suero. De esta manera se escogió la dilución idónea para trabajar.

Titulación del suero hiperinmune α-NSP3 por inmunofluorescencia

Se tituló el suero α-NSP3 por la técnica de inmunofluorescencia. Se sembraron 1.2 X 10⁴ células BSC-1 en placas de 16 pozos y se dejaron crecer por 4 días a 37 °C con una atmósfera de CO₂ del 5%. Se infectaron las células con RV SA11 activado con tripsina (protocolo mencionado anteriormente) con una M.O.I de 0.8 y se dejó la infección por 12-16 hrs a 37 °C con una atmósfera de CO₂ del 5%. Se fijaron las células infectadas con 200 µL de PFA 4% (PFA 4% en PBS pH 7.2) por 15 min a temperatura ambiente, se

lavarón 3 veces con 200 μ L de PBS A 1X a 4 °C, se permeabilizaron las células con 200 μ L de PBT (PBS completo 1X, 0.1 % de triton X100) por 10 min, se retiró la solución y se bloqueó por 1 hr con 200 μ L de PBT-BSA 1% (1% BSA en PBT). Se desechó la solución PBT-BSA 1%, se colocaron los sueros α -NSP3 en diferentes diluciones (1:1,000, 1:2,000, 1:4,000, 1:8,000, 1:16,000, 1:32,000, 1:64,000 y 1:128,000) y se incubó por 1 hr a temperatura ambiente. Se lavó 3 veces la placa con 200 μ L de PBT-BSA 1%, se colocó α -IgG de rata Alexa 555 (Invitrogen[®]) con una dilución de 1:1000 por 1 hr a temperatura ambiente y se lavó la placa 3 veces con 200 μ L de PBS A 1X. Se agregó 50 μ L (1 μ g/mL) de reactivo de DAPI (diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol, Sigma-Aldrich[®]) a cada pozo, se dejó por 1 min a temperatura ambiente y se lavó 3 veces la placa con 200 μ L PBS 1X. Por último se añadieron unas gotas de medio de montaje DAKO Cytomation[®] y se cubrió con un cubre objetos de vidrio y se selló con barniz de uñas. Se dejó reposar la laminilla, se observó en el microscopio de inmunofluorescencia y se realizó la titulación del suero. De esta manera se determinó la dilución idónea para trabajar.

Detección de la proteína NSP3 por Western blot

Se detectó la proteína NSP3 de células BSC-1 infectadas con SA11 o RRV con el suero α -NSP3. Las muestras fueron proporcionadas por el Dr. Carlos Guerrero, quien sembró e infectó células BSC-1 con RV SA11, RRV o sin infectar (protocolo anteriormente mencionado); posteriormente las cosechó a las 6, 9 ó 24 hrs post infección o sin infectar en tubos de 1.5 ml, sonicó las muestras para provocar una lisis celular y las almacenó a -20 °C. Se corrieron 10 μ g de proteínas totales, que fueron previamente cuantificadas por el método de Bradford, en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 12.5%. Una vez separadas las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa en BT. La membrana fue previamente equilibrada con agua durante 10 min. La transferencia se hizo

a 180 mA/hr en una cámara semi-seca. La membrana se lavó con TBS por 5 min, se bloqueó con TTBS más 5% de leche por 1 hr a temperatura ambiente en agitación suave. Se colocaron los sueros α -NSP3 a una dilución de 1:20,000 con TTBS más 1% de leche en diferentes membranas con las mismas muestras y se incubaron toda la noche a 4 °C con agitación constante. Se lavó la membrana 3 veces con TTBS por 5 min, se colocó el α -IgG de rata biotinilado (Zymed[®]) a una dilución de 1:10,000 y se incubó por 2 hrs a temperatura ambiente con agitación constante. Se lavó la membrana 3 veces con TTBS por 5 min., se colocó la avidina-peroxidasa (Sigma[®]) a una dilución de 1:10,000 (stock 1mg/mL) y se incubó por 2 hrs a temperatura ambiente con agitación constante, Se detectó la señal de la membrana con el kit Super West Femto Maximum Sensitivity Substrate[®], se colocó la película de plástico sobre la membrana y se reveló. Con ayuda del marcador de peso molecular pre-teñido fue identificada la proteína recombinante viral de interés.

Resultados

Proteína VP2

Identificación genotípica del RV SA11 por electroforesis

Los RV presentan un patrón característico de 11 bandas de RNA_{dc} genómico al ser analizados por electroforesis en gel de poliacrilamida de ácidos nucleicos y tinción con nitrato de plata. El patrón consiste de cuatro grupos de bandas: 1-4, 5-6, 7-9, 10-11. Se realizó la identificación genotípica del RV SA11 mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida al 7.5%. Se observó el patrón esperado de cuatro grupos de bandas, sin embargo también se puede observar que en las cepas SA11-P-1 y SA11-P-2 se distinguen algunas bandas tenues adicionales a las 11 que caracterizan a los RV, las cuáles son más evidentes en la siguiente generación SA11-P-3. En esta última generación, también se ve un doblete en el segmento de interés, pero con un tamaño menor. Por lo tanto, la cepa SA11-P-3 podría presentar una población genéticamente heterogénea o podría estar contaminada por otra cepa de RV (Fig. 9). Se tomo la decisión de proseguir con la obtención del cDNA del segmento 2 de la cepa SA11-P-3, porque se ha reportado que dentro de la misma cepa SA11 existe alguna heterogeneidad genómica lo cual afecta la migración de los segmentos cuando son analizados en geles de poliacrilamida (Pereira et al 1983; Pereira et al 1984), y por la especificidad de los oligonucleótidos hacia segmento 2.

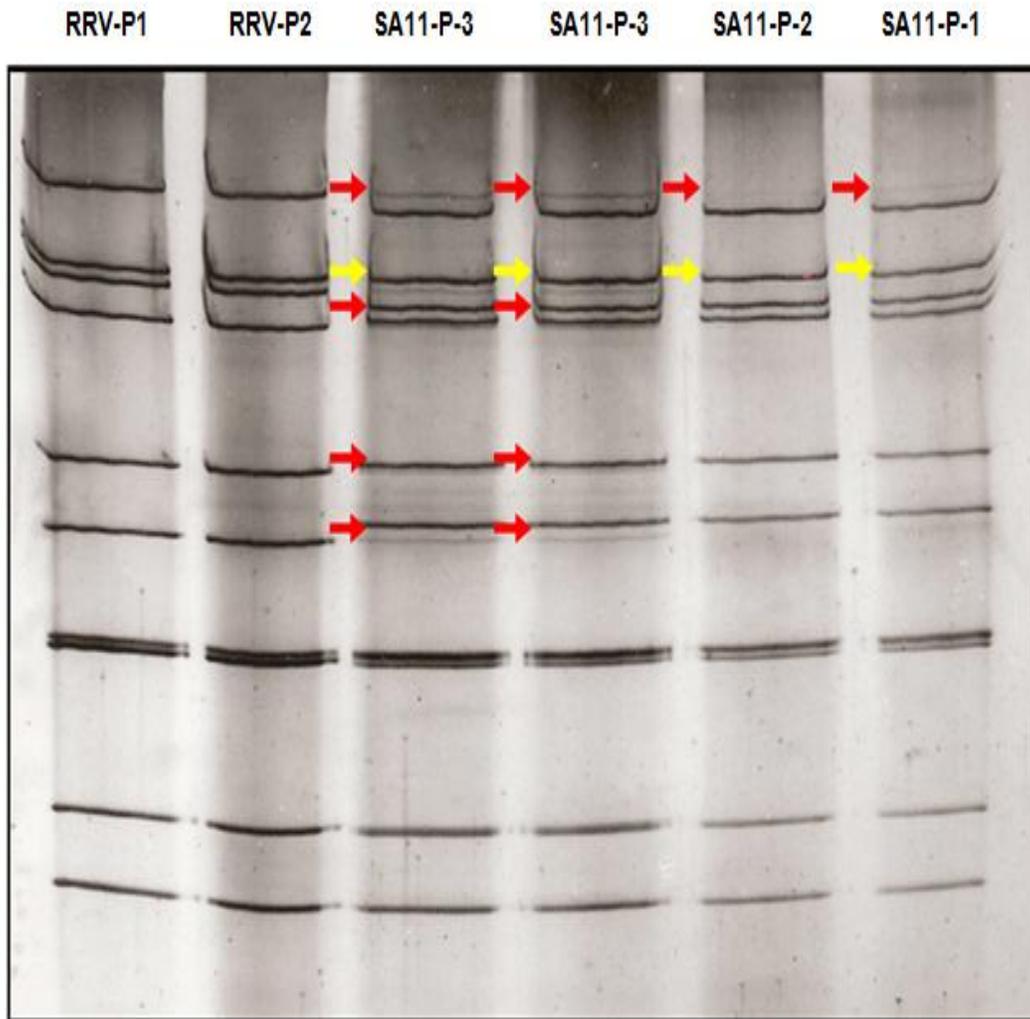


Figura 9. Electroforesis de RNAc viral en gel de poliacrilamida al 7.5%. RRV y SA11 son cepas de RV y P indica el número de pase. Las flechas rojas señalan los lugares donde se presentan las dobles bandas. Las flechas amarillas señalan el segmento 2. SA11 y RRV son cepas de RV.

Extracción y purificación del RNAc del RV SA11

Se extrajo el RNA viral de 90 mL de cultivo de células MA104 infectadas con RV SA11.

Posteriormente, el RNA viral se purificó por columnas para eliminar al máximo cualquier impureza que pudiera afectar la reacción de RT-PCR (Fig. 10).

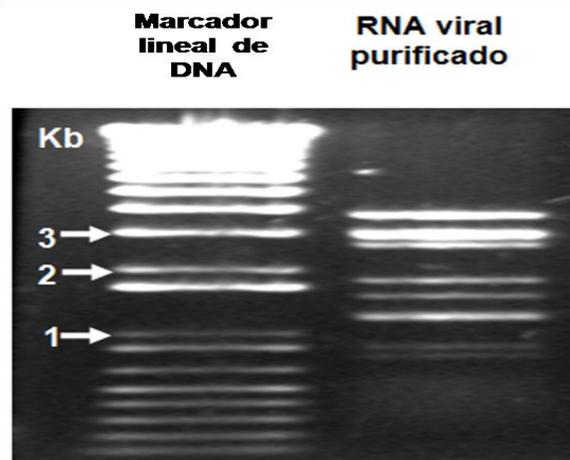


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1% para observar la muestra purificada de RNAc viral de la cepa SA11-P-3.

Obtención y amplificación del cDNA del segmento 2 del RV SA11

Para la obtención del cDNA del segmento 2 se diseñaron dos oligonucleótidos que incluyen un sitio de restricción específico a cada extremo del segmento. Estos sitios de restricción sirven para insertar el cDNA del segmento 2 en el plásmido pET28b(+) en forma direccional.

Se obtuvo el cDNA del segmento 2 del RV SA11-P-3 con el tamaño esperado de 2.6 kb a partir de la RT-PCR y posteriormente se amplificó por PCR. Se purificó el cDNA para eliminar fragmentos incompletos e impurezas que puedan intervenir en las reacciones de digestión. Por último se verificó la integridad de éste y se cuantificó (Fig. 11).

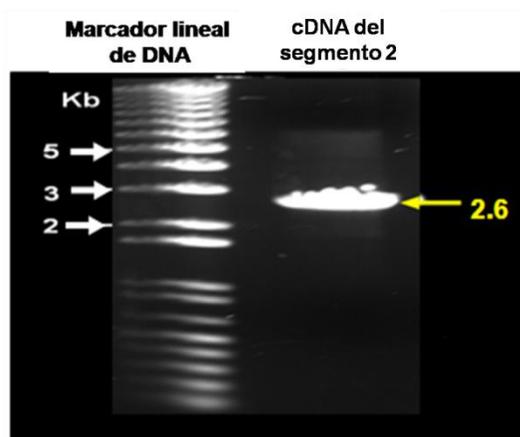


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1% para verificar el tamaño y la integridad del cDNA del segmento 2. La flecha amarilla señala el producto de PCR.

El cDNA del segmento 2 fue sometido a una reacción de digestión secuencial por las enzimas *Xho I* y *Nco I*, las cuales dejaron los extremos cohesivos para su inserción en el plásmido pET28b(+).

Purificación del vector de expresión pET28b(+)

Se purificó el vector pET28b(+) a partir de las bacterias *E. coli* BL21 (DE3) transformadas, posteriormente se realizó una reacción de restricción con la enzima *Xho I* y se verificó su tamaño en condiciones de superenrollado y lineal (Fig. 12).

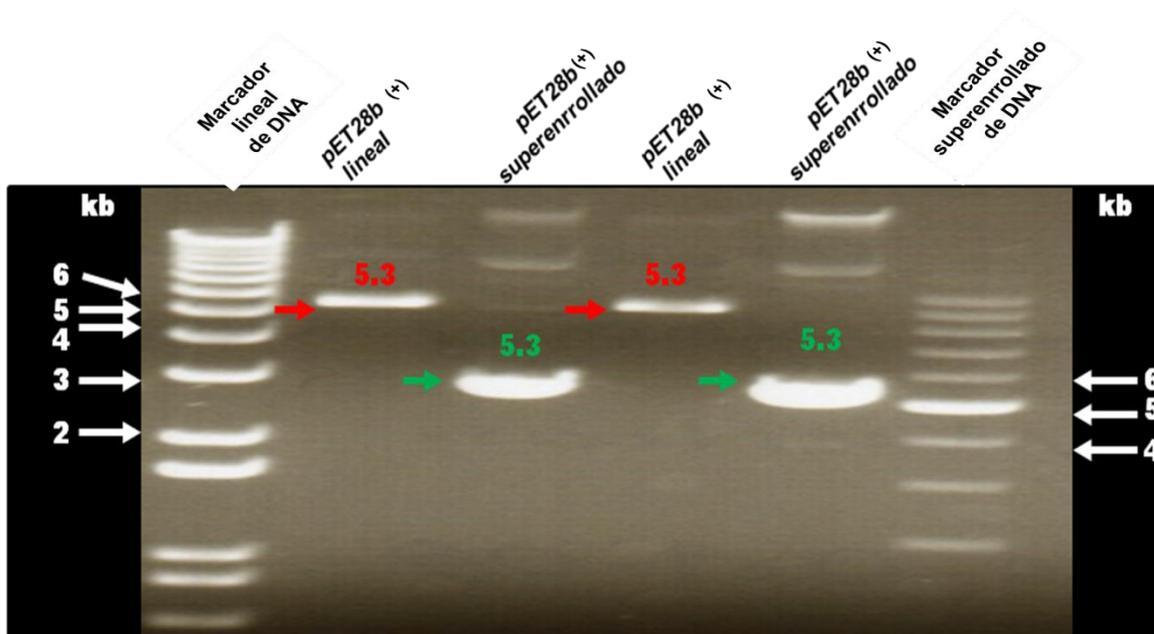


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa al 1% para verificar el tamaño del plásmido pET28b(+). La flecha roja señala al plásmido lineal y la flecha verde señala el plásmido superenrollado.

El plásmido fue sometido a reacciones de digestión con las enzimas *Xho I* y *Nco I* en forma secuencial, las cuales dejaron los extremos listos para la inserción del cDNA del segmento 2. Por último, el plásmido lineal fue sometido a una reacción de desfosforilación para evitar la posible recirculación.

Verificación y análisis del plásmido recombinante pET28b-SA11-2 en las bacterias *E. coli* XL-Blue

Los productos de digestión fueron sometidos a una reacción de ligación, incubándola a 14°C por 22 hrs con una relación molar de 5:1 (inserto:vector). El plásmido recombinante pET28b-SA11-2 fue insertado en bacterias de clonación *E. coli* XL-Blue por electroporación y se incubaron en cajas con agar selectivo LB-Kan. Se obtuvieron sólo 5 posibles colonias positivas, las cuales se dejaron crecer por 8 hrs en medio selectivo LB-Kan y se extrajo el plásmido recombinante, las cuales fueron sometidos una reacción de digestión para linealizar (enzima *Xho* I) y liberar el inserto (enzimas *Xho* I y *Nco* I). Sólo en dos colonias (clona 1 y clona 2) se obtuvo el peso esperado del plásmido recombinante pET28b-SA11-2 de 7.9 kb y se observó la liberación del inserto 2.6 kb. De esta forma, se confirmó la clonación del segmento 2 del RV SA11 en el plásmido pET28b(+) (Fig. 13).

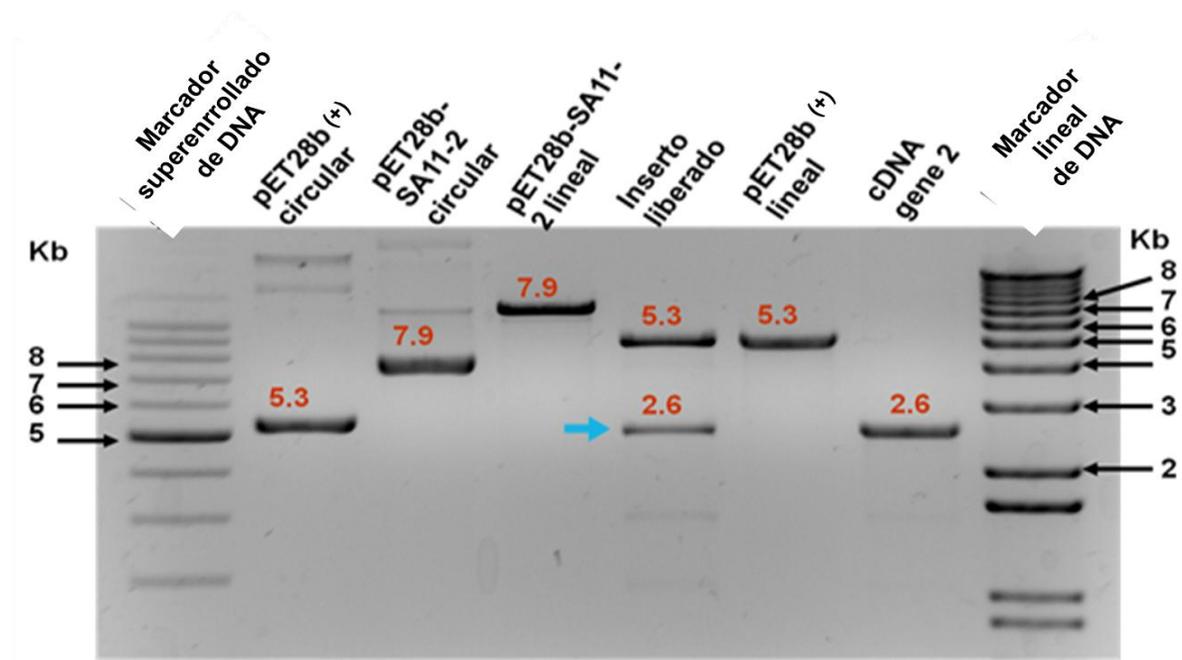


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 1% para verificar la presencia del inserto del segmento 2 de SA11 en el plásmido pET28b-SA11-2 de la clona 1. Los números en color rojo muestran el tamaño en kb. La flecha azul indica al inserto correspondiente del segmento 2 liberado.

Verificación y análisis del plásmido recombinante pET28b-SA11-2 en bacterias *E. coli* BL21 (DE3) y BL21 (DE3) pPRIL

Las dos clonas obtenidas de las bacterias *E. coli* XL-Blue fueron sometidas a los mismos procedimientos, pero sólo se presentan los resultados de la clona 1 por cuestiones prácticas. El paso siguiente fue la expresión de la proteína recombinante, se extrajo el plásmido pET28b-SA11-2 de la cepa XL-Blue, se introdujo en las bacterias de expresión *E. coli* BL21 (DE3) y BL21 (DE3) pPRIL por choque térmico y se verificó la presencia del plásmido recombinante.

En el caso de la cepa BL21 (DE3) se realizó una reacción de digestión para linealizar el plásmido recombinante (enzima *Xho* I) y liberar el inserto (enzimas *Xho* I y *Nco* I), porque las clonas presentaban (aparte de la banda de interés de 7.9 kb) otra banda de aproximadamente 5 kb o diferente patrón de bandeos. Con los resultados obtenidos de la reacción de digestión se confirmó que se tenía la clona con el plásmido recombinante (Fig. 14).

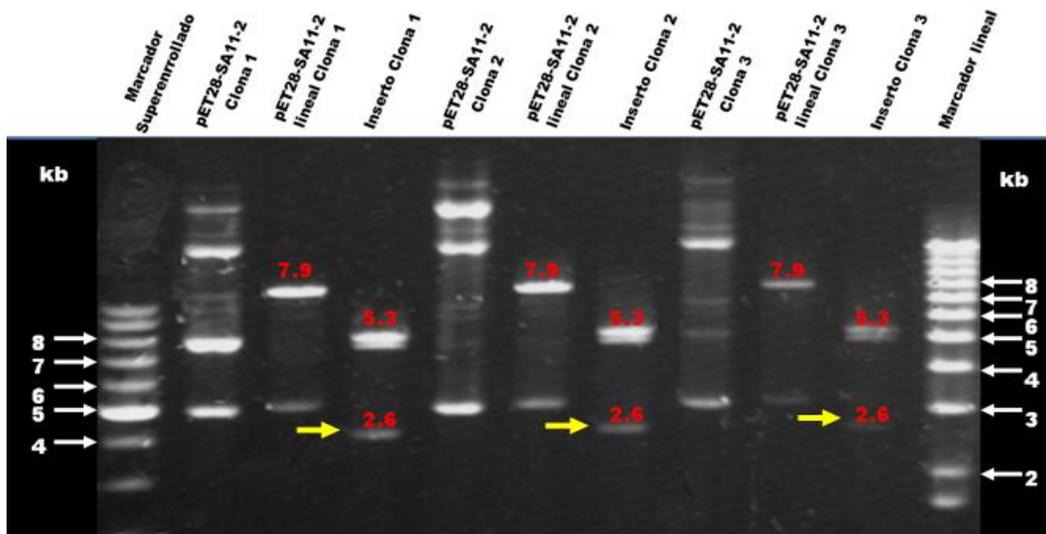


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 1% para verificar la presencia del plásmido recombinante pET28b-SA11-2. En todas las clonas el patrón de bandeos difiere pero se puede observar que cuando son digeridas, el inserto es liberado (flecha amarilla).

Con respecto a la cepa BL21 (DE3) pPRIL, se observó que el patrón de bandeo es similar para las cuatro clonas con una banda de pET28b-SA11-2 del tamaño de 7.9 kb esperado, mientras que de las bacterias transformadas con pET28b(+), en solo una de cuatro clonas analizadas se observa claramente la banda esperada de 5.3 kb (Fig. 15).

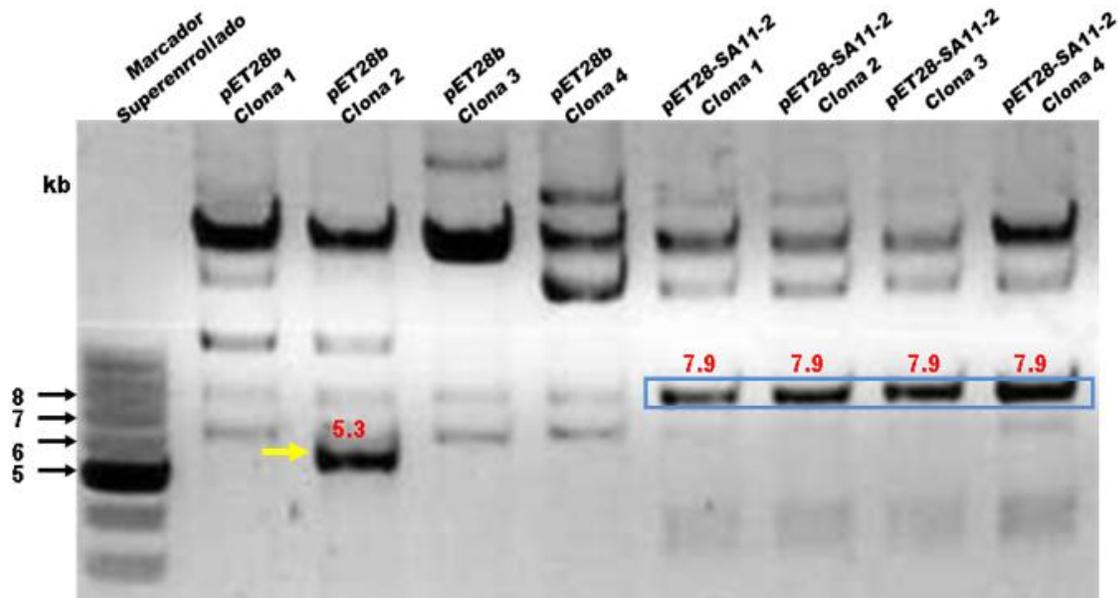


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa al 1% para verificar la presencia del plásmido recombinante pET28b-SA11-2. En todas las clonas con el plásmido recombinante presentan la banda esperada y el mismo patrón de bandeo (cuadro azul). La flecha en amarillo señala el plásmido pET28b(+).

Expresión y análisis de la proteína recombinante VP2 por gel de Coomassie

Se realizó la inducción con IPTG para la expresión de la proteína rVP2 con ambas cepas. Para verificar si la proteína se expresó, se sonicó 1mL de cada muestra y se analizaron las proteínas totales, insolubles y solubles con la finalidad de saber si la proteína es soluble o insoluble.

Los cultivos inducidos de la cepa BL21 (DE3) con el plásmido pET28b-SA11-2 presentan un patrón de bandeo similar a los no inducidos con el mismo plásmido y a los controles que solo tienen el plásmido pET28b(+) (Fig. 16).

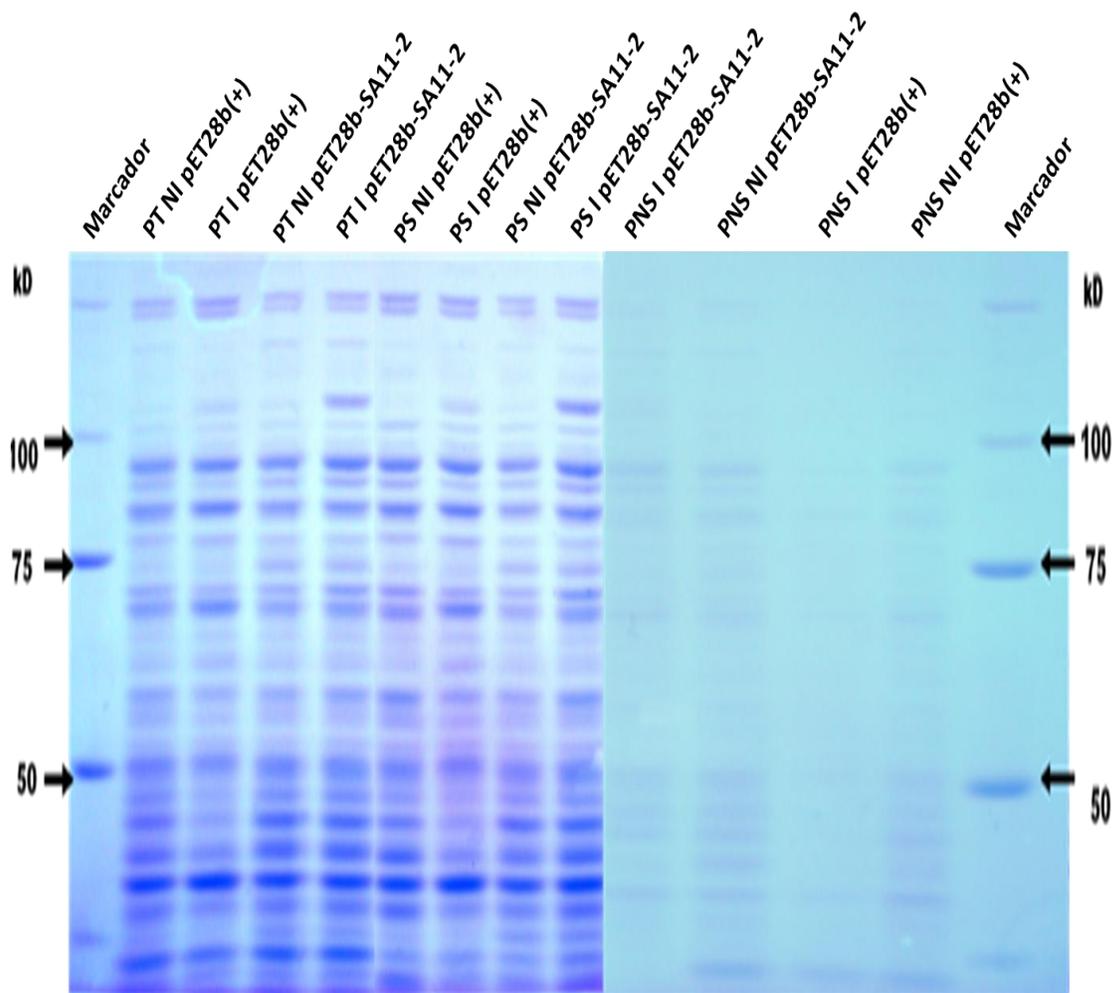


Figura 16. Electroforesis de proteínas de la cepa BL21 (DE3) transformadas con pET28b(+) o pET28b-SA11-2 en gel de poliacrilamida desnaturalizante al 7.5%. Se corrieron proteínas totales (PT), proteínas solubles (PS) y proteínas insolubles (PNS), obtenidas tanto en condiciones de inducción (I) como no inducidas (NI). Se observa que en ninguna muestra de proteínas se presenta la banda de interés de un peso de migración de 94 kD.

Para la cepa BL21 (DE3) pPRIL inducidas se logró visualizar una banda con el peso de migración esperado para la proteína recombinante VP2 en las muestras inducidas de proteínas totales e insolubles (Fig. 17).

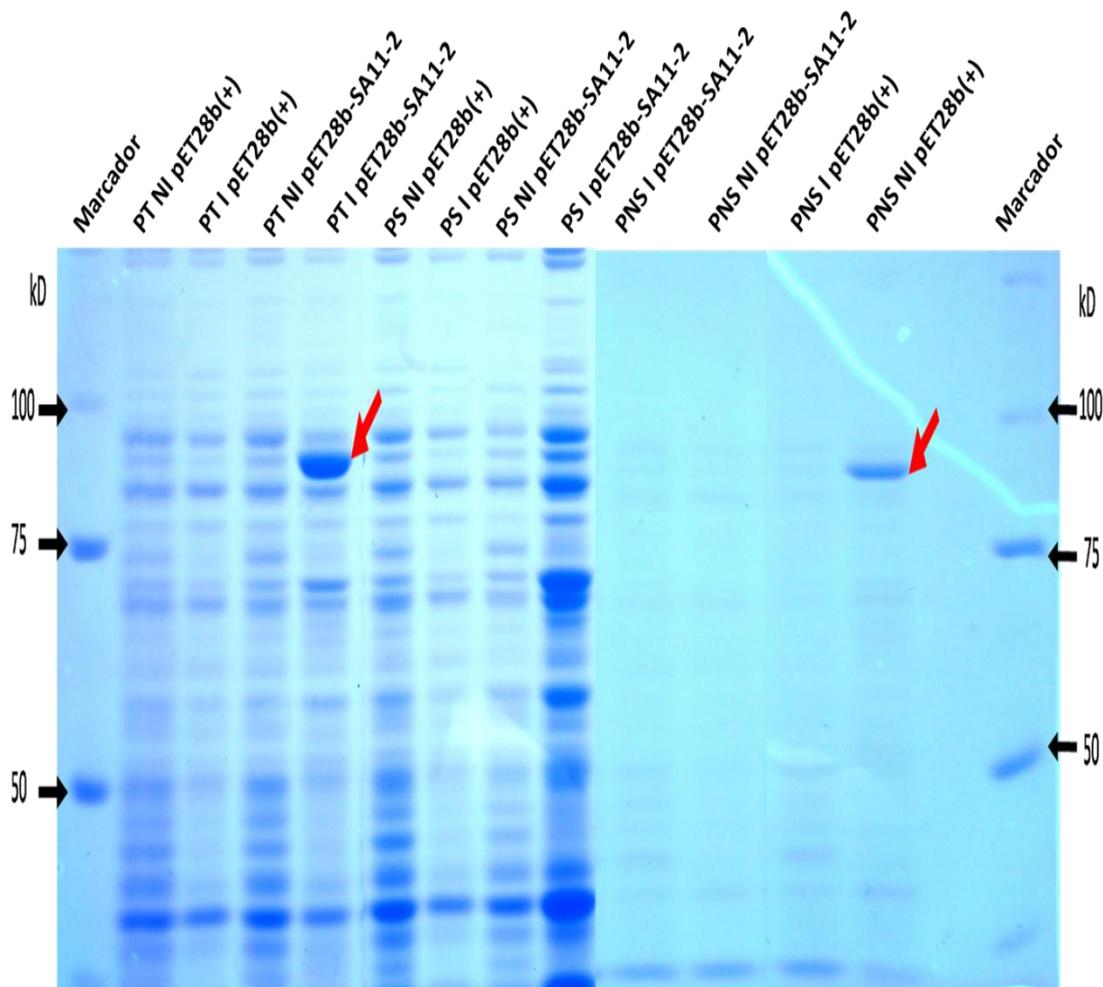


Figura 17. Electroforesis de proteínas de la cepa BL21 (DE3) pPRIL en gel de poliacrilamida desnaturalizante al 7.5%. Se corrieron proteínas totales (PT), proteínas solubles (PS) y proteínas insolubles (PNS), obtenidas tanto en condiciones de inducción (I) como no inducidas (NI). Se observa que solo las muestras inducidas de proteínas totales e insolubles con el plásmido pET28b-SA11-2 se presenta la banda de interés de la proteína recombinante VP2 de un peso de migración de 94 kD (indicada por la flecha roja).

De acuerdo con los resultados, la expresión de la proteína VP2 sólo fue visible en la cepa pPRIL. La explicación de estos resultados, es que la cepa BL21 (DE3) pPRIL expresa RNAs de transferencia comunes de células eucariontes que pueden ser usados en la expresión de la proteína rVP2 obteniendo un mejor rendimiento, si tomamos en cuenta que la proteína VP2 *in vivo* solo se expresa en células eucariontes. También se observó que rVP2 es una proteína insoluble.

Detección de la proteína rVP2 por Western blot

Se realizó un ensayo de Western blot para saber si la proteína expresada es en realidad rVP2. Se utilizó el AMC 6E8/3A8 de ratón contra VP2 para detectar dicha proteína (Fig. 18).

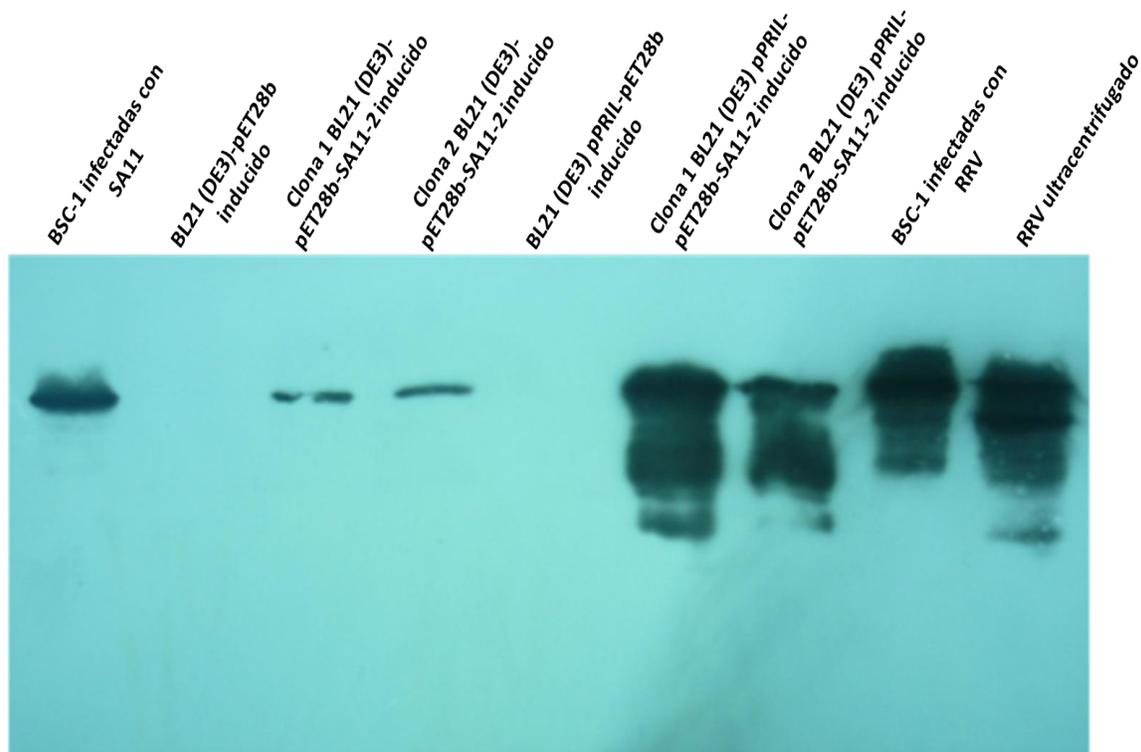


Figura 18. Western blot de proteínas de células infectadas con RV, RV ultracentrifugado, o rVP2 contra AMC anti-VP2, a una dilución de 1:2,500.

El AMC 6E8/3A8 de ratón detectó la proteína VP2 de células BSC-1 infectadas con los RV SA11 y RRV, RV RRV ultracentrifugado y de rVP2 expresadas de ambas cepas de *E. coli*. Los resultados de este ensayo confirman que en la cepa BL21 (DE3) expresa en menor cantidad rVP2, en comparación a la cepa BL21 (DE3) pPRIL. También se observa que la proteína recombinante presenta una posible degradación.

Análisis de la secuencia del segmento 2 y la secuencia de aa de la proteína rVP2

Una vez obtenida la secuencia del segmento 2 de la clona SA11-2 de la cepa BL21 (DE3) pPRIL (el plásmido recombinante pET28b-SA11-2 de esta cepa deriva de la clona 1 de las bacterias *E. coli* XL-Blue), por cuestiones prácticas, denominamos nuestra secuencia “Padilla” por el laboratorio de origen. Se efectuó un alineamiento con el programa CLC Main Workbench version 5.6® y DNAMAN® con la secuencia AF474406 de la Dra. Estes, en adelante llamada “Estes cl.3”, obteniendo un 98% de identidad. Posteriormente, realizamos otros alineamientos con otras secuencias del segmento 2 de la cepa SA11 de RV reportadas en el Genebank, sólo la secuencia NC_011506.1 reportada por el Dr. Patton tuvo una identidad del 99%, la cual nombramos “Patton”.

Se usaron ambas secuencias del segmento 2 de SA11 para comparar nuestra secuencia. Hay que aclarar que para dicho análisis se excluyó la secuencia que codifica la cola de histidinas y de los aa leucina y ácido glutámico ubicados antes de la cola de histidinas introducidos al clonar (Fig. 19). Los resultados arrojados por el alineamiento, se resumen en la Tabla 3.

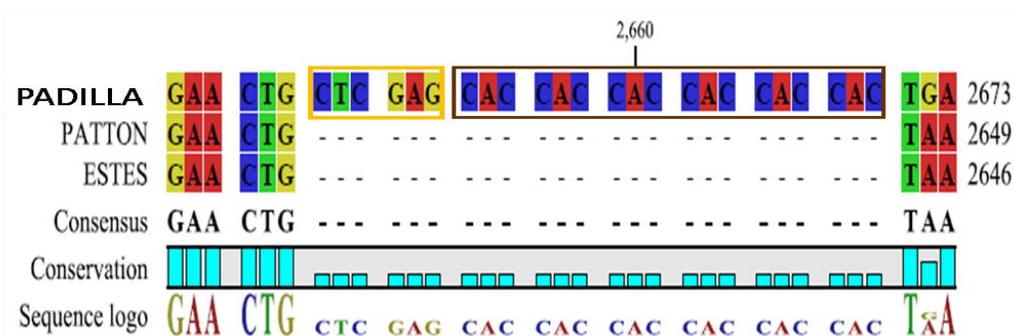


Figura 19. Parte final del extremo 3’de las secuencias de estudio. En el cuadro amarillo señala la secuencia que codifica para los aa leucina y ácido glutámico, y el cuadro café para la cola de histidinas de la secuencia clona SA11-2.

Tabla 3. Diferencias de las secuencias de los segmentos 2 del RV SA11 cepas “Estes cl.3” y “Patton” en relación a la cepa “Padilla”.

Se muestran las diferencias principales de las dos secuencias registradas en el Genebank vs la secuencia “Padilla” de 2649 nucleótidos sin contar los nucleótidos que codifican para la leucina, ácido glutámico y la cola de histidinas.

Secuencia	Diferencia nucleótidos	de	Nucleótidos faltantes	Total de nucleótidos a partir del codón de inicio
Patton	1		0	2649
Estes cl.3	29		3	2646

La secuencia “Estes cl.3” presenta una mayor diferencia de nucleótidos y por otro lado cuenta con un codón menos (Fig. 20 a). En la secuencia “Patton” solo existe una diferencia de nucleótido, pero este se da al principio de un codón provocando un cambio en la lectura de traducción (Fig. 20 b.).

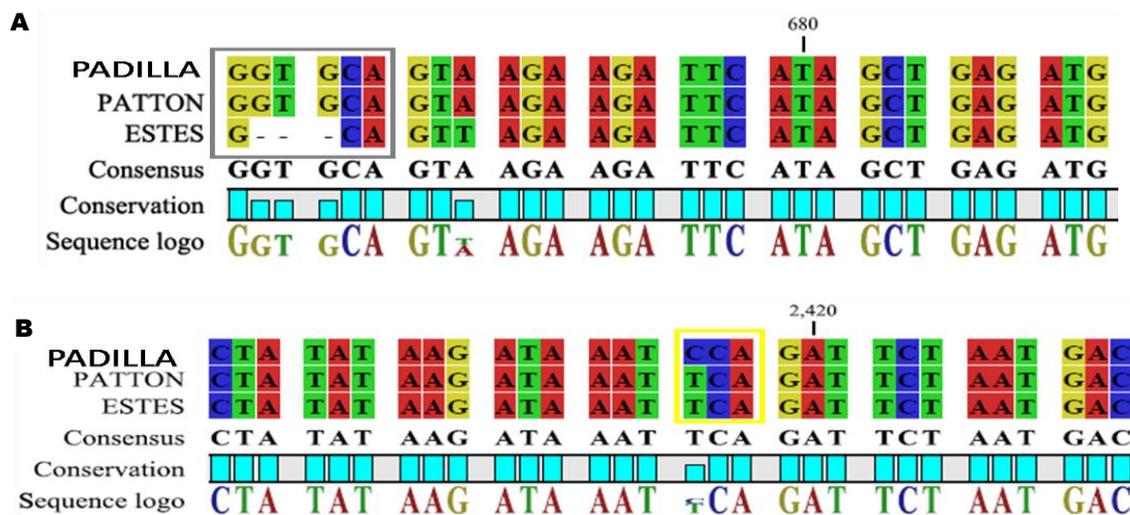


Figura 20. Alineación de tres secuencias del segmento 2 del RV SA11. A) El cuadro gris muestra el lugar donde la secuencia “Estes cl.3” tiene una ausencia de tres nucleótidos, B) El cuadro amarillo señala el lugar donde se presenta la diferencia del nucleótido de la secuencia “Padilla” y “Patton” provocando un cambio de aa en la lectura de traducción.

Posteriormente se elaboró un alineamiento de las secuencias de estudio, pero ahora con las secuencias de aa para observar donde ocurrieron los cambios de los residuos; se usaron los mismos programas. En la Tabla 4 se presentan los resultados.

Tabla 4. Residuos que difieren de las tres secuencias del segmento 2 de RV SA11.

Comparación de los residuos diferentes entre las secuencias de estudio. * aa ausente debido al codón faltante, por lo tanto la numeración de los residuos de la secuencia se recorrió un número.

Secuencias			Observaciones
Padilla	Patton	Estes cl.3	
Lisina (41)	Lisina (41)	Arginina (41)	Estos tres residuos pertenecen al grupo de aa polares cargados positivamente.
Lisina (64)	Lisina (64)	Arginina (64)	Estos tres residuos pertenecen al grupo de aa polares cargados positivamente.
Lisina (65)	Lisina (65)	Arginina (65)	Estos tres residuos pertenecen al grupo de aa polares cargados positivamente.
Treonina (219)	Treonina (219)	Prolina (219)	Los residuos difieren de grupo. La treonina pertenece al grupo de aa polares sin carga y la prolina al grupo de aa no polares.
Ácido glutámico (220)	Ácido glutámico (220)	Lisina (220)	Los residuos difieren de grupo. El ácido glutámico pertenece al grupo de aa polares cargados negativamente y la lisina al grupo de aa polares cargados positivamente.
Glicina (221)	Glicina (221)	*	El alineamiento, nos indicó que este lugar corresponde al residuo faltante en la secuencia AF474406. En las otras dos secuencias se presenta una glicina que pertenece al grupo de aa polares sin carga.
Aspartato (270)	Aspartato (270)	Valina (269)	Los residuos difieren de grupo. El aspartato pertenece al grupo de aa polares cargados negativamente y la valina al grupo de aa no polares.
Isoleucina (271)	Isoleucina (271)	Tirosina (270)	Los residuos difieren de grupo. La isoleucina pertenece al grupo de aa no polares y la tirosina al grupo de aa polares sin carga.
Fenilalanina (603)	Fenilalanina (603)	Serina (602)	Los residuos difieren de grupo. La fenilalanina pertenece al grupo de aa no polares y la serina al grupo de aa polares sin carga.
Prolina (806)	Serina (806)	Serina (805)	Los residuos difieren de grupo. La prolina pertenece al grupo de aa no polares y la serina al grupo de aa polares sin carga.

Sólo un residuo difiere entre las secuencias "Padilla" y "Patton", mientras la secuencia "Estes cl.3" presenta 9 residuos diferentes y la ausencia de uno.

Con respecto al cambio de aa (serina a prolina, 806) presente en la secuencia "Padilla" al compararla con la de "Patton", ésta se conserva en la secuencia "Estes cl.3". Por este motivo realizamos otro alineamiento con la secuencia "Padilla" con las demás secuencias

reportadas para el segmento 2 de RV del grupo A en el Genbank. Se utilizó el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), con el cual realizamos el alineamiento con 100 secuencias reportadas para el segmento 2 de diferentes cepas de RV del grupo A. Se encontró que solo nuestra secuencia presenta el residuo de prolina (806), en todas las secuencias analizadas se conserva el residuo de serina. Este análisis nos indica que es más probable que la secuencia "Padilla" presente una mutación en vez de ser una variante genotípica del segmento 2 de RV.

Por otro lado, la proteína rVP2 fue reconocida por un AMC en condiciones desnaturalizantes, por lo cual podemos asegurar que nuestra proteína recombinante es antigénicamente idéntica o muy similar a la VP2 de otras cepas de SA11, por lo tanto es susceptible de ser utilizada para producir un suero hiperinmune.

Proteína NSP3

Antecedentes: La construcción del plásmido recombinante pET28b-SA11-7 donde se inserto el segmento 7 del RV SA11 que codifica para la proteína NSP3 fue realizado por la estudiante Maritrini Colón González de la Licenciatura de Investigaciones Biomédicas Básica, UNAM.

Obtención del plásmido recombinante pET28b-SA11-7 de las bacterias

A partir de bacterias *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el vector pET28b-SA11-7 se descongelaron y se verificó la presencia del plásmido recombinante, se realizó una reacción de restricción con la enzima *Bgl* II y se verificó su tamaño en condiciones de superenrollado y lineal de 6.4 kb. (Fig. 21).

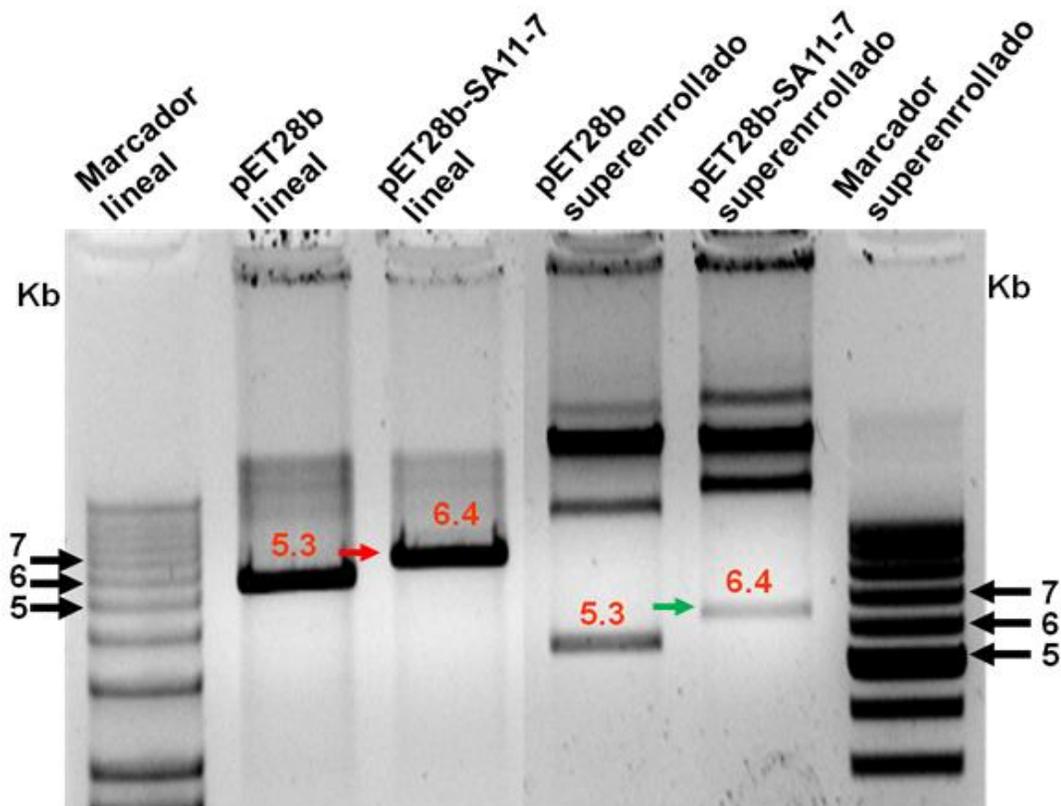


Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa al 1% para verificar el tamaño del plásmido pET28b-SA11-7. El plásmido tiene el tamaño esperado de forma lineal (flecha roja) y superenrollado (flecha verde) de 6.4 kb.

Expresión y purificación de la proteína rNSP3

Se realizó la inducción con IPTG con las clonas positivas y controles, como se menciona en la metodología para la expresión de la proteína rNSP3 en la cepa BL21 (DE3). Para verificar si la proteína se expresó, se sonicó 1mL de cada muestra y se analizaron como proteínas totales, insolubles y solubles.

Las muestras no inducidas de proteínas totales e insolubles correspondientes al plásmido recombinante presentan una banda con el peso esperado de la proteína rNSP3, la cual no se presenta en las muestras que tienen solo el plásmido pET28b(+). Este resultado es contrario a lo esperado, ya que al no ser inducida la expresión, esperábamos ausencia de la proteína recombinante en cualquier condición (Fig. 22).

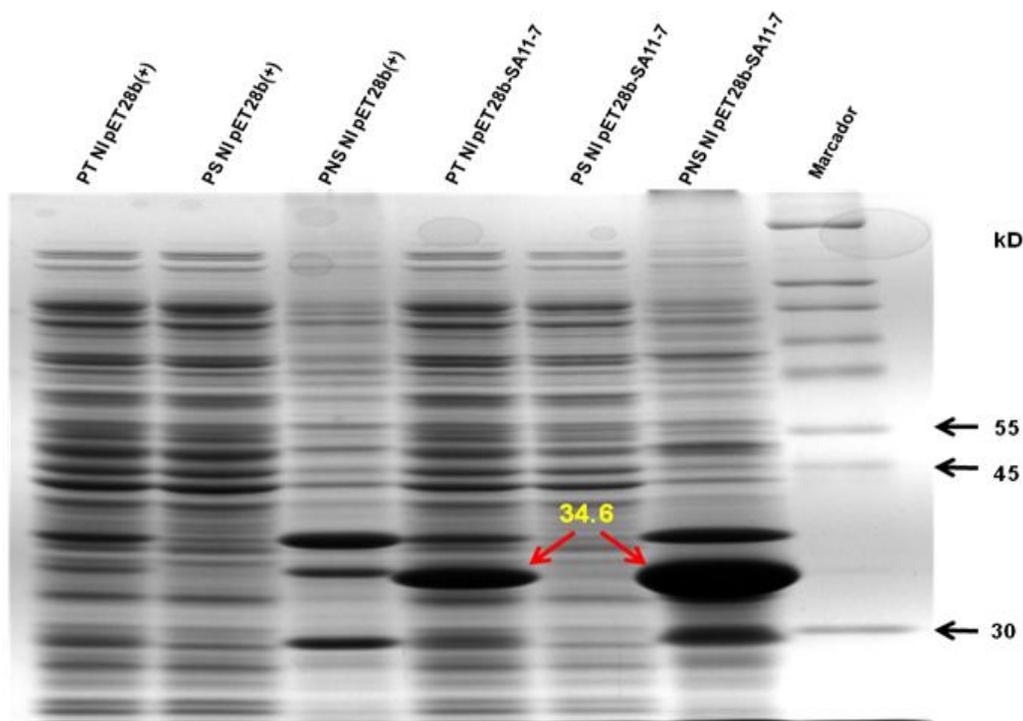


Figura 22. Electroforesis de proteínas de las muestras no inducidas en gel de poliacrilamida al 12.5%. Se corrieron proteínas totales (PT), proteínas solubles (PS) y proteínas insolubles (PNS), obtenidas en condiciones de no inducidas (NI). Se observa que las muestras de proteínas totales e insolubles presentan la banda de interés de 34.6 kD (Flechas rojas)

Con respecto a las muestras inducidas de proteínas totales e insolubles que tienen el plásmido recombinante, presentan una banda con el peso esperado de 34.6 kD de rNSP3 (Fig. 23).

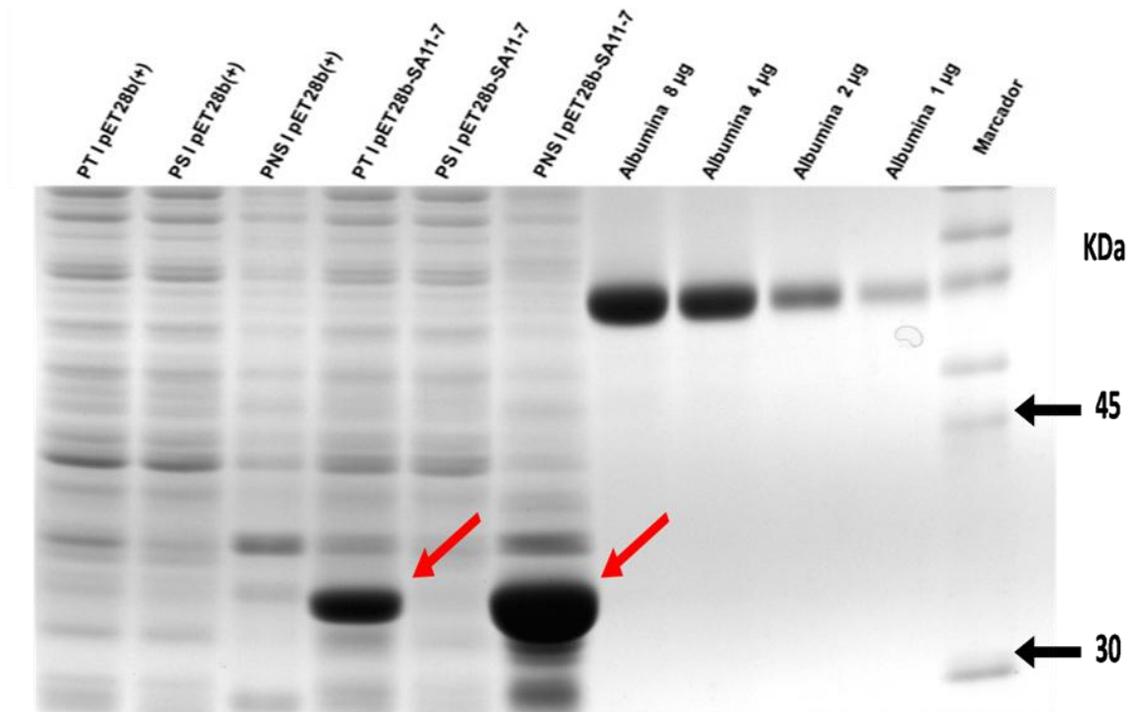


Figura 23. Electroforesis de proteínas de las muestras inducidas con IPTG por 5 horas en gel de poliacrilamida al 12.5%. Se corrieron proteínas totales (PT), proteínas solubles (PS) y proteínas insolubles (PNS), obtenidas en condiciones de inducción (I). Se observa que las muestras con el plásmido recombinante de proteínas totales e insolubles presentan la banda de interés de 34.6 kD (Flechas rojas)

Como se puede observar en las figuras 22 y 23, las muestras que contienen el plásmido recombinante pET28b-SA11-7 que fueron inducidas y no inducidas presentan la misma banda que corresponde al peso esperado de la proteína recombinante NSP3, en los carriles de proteínas totales e insolubles, ésto nos indica que la proteína es insoluble. Una posible explicación de la producción de rNSP3 en bacterias no inducidas, podría ser una mutación en el gen represor ú operador provocando un cambio en la regulación. A pesar de este inconveniente, se prosiguió a realizar la purificación de la proteína rNSP3.

La purificación de la proteína rNSP3 se realizó mediante cromatografía de afinidad con agarosa-Níquel, la cual se une covalentemente a la proteína por medio de la cola de histidinas introducidas al ser clonada. Se desprendió a rNSP3 de la agarosa-Níquel con imidazol, el cual desplaza la proteína unida y la libera. Se dializó la proteína recombinante para renaturalizarla y eliminar la urea. Parte de la proteína recombinante se va perdiendo durante la purificación, así como la mayor parte de la proteína renaturalizada se encuentra en forma insoluble. El paso siguiente fue la de cuantificar la concentración y la pureza de rNSP3 mediante densitometría óptica, para lo cual se corrieron diferentes concentraciones de la proteína en gel de poliacrilamida al 12.5% y teñido con azul de Commassie (Fig. 24).

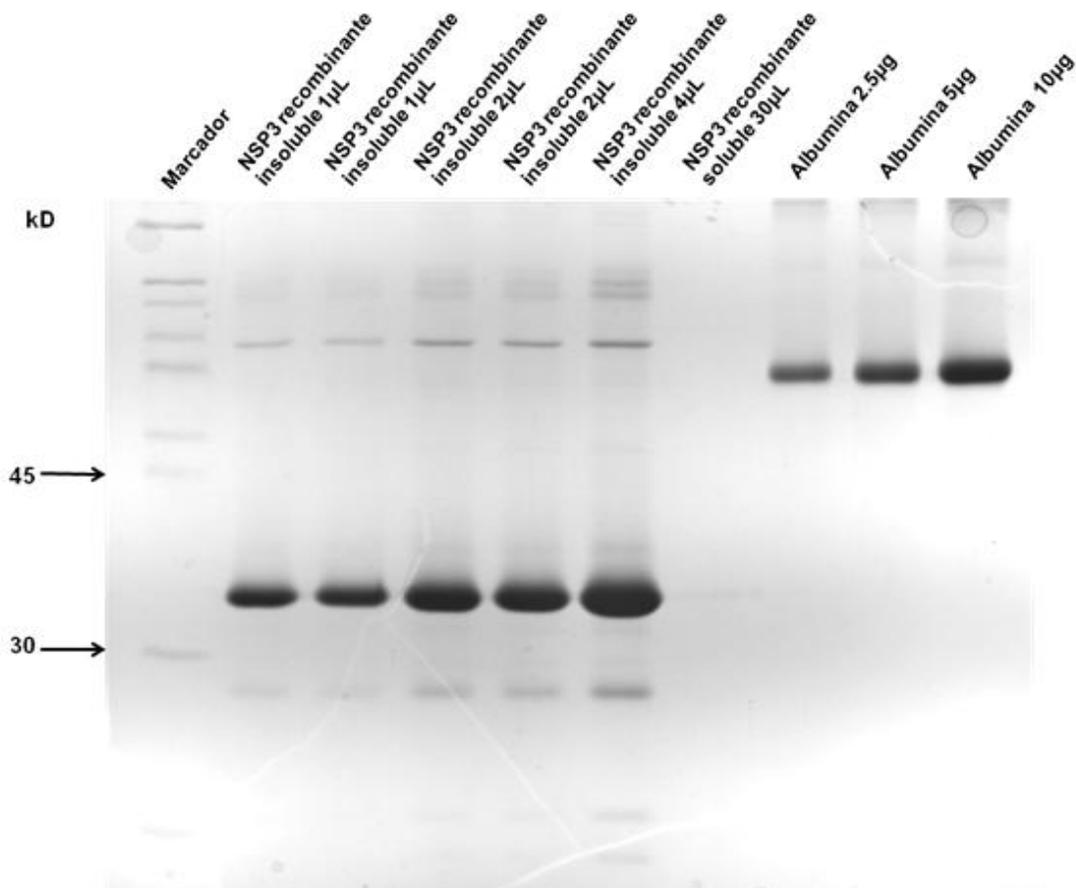


Figura 24. Electroforesis de la proteína recombinante NSP3 en gel de poliacrilamida al 12.5% para realizar la cuantificación y pureza.

Se calculó la concentración de la proteína purificada con el programa Kodak Molecular Imagen® y la pureza con el programa ImageJ. Se obtuvo una concentración de 4141.12 µg de fracción insoluble y 291.51 µg de fracción soluble, teniendo un total de 4432.63 µg de la proteína recombinante a partir de 350 ml de cultivo y una pureza del 87.35%.

Con los resultados obtenidos, se prosiguió a la inmunización de dos ratas, a las cuales se les suministraron 5 dosis de 200 µg cada uno, cada 15 días; la primera dosis se mezcló con adyuvante completo y las 4 restantes con adyuvante incompleto, la aplicación se realizó por vía intraperitoneal.

Una vez aplicadas las 5 dosis, se obtuvo el suero hiperinmune y se tituló por diferentes técnicas.

Titulación del suero hiperinmune anti-NSP3 por inmunoperoxidasa

Se probó el suero de la pre-inmunización, así como de la 4^o y la 5^o inmunización obtenido de cada rata; el ensayo se realizó en células MA104 infectadas con RV SA11 con una M.O.I. de 0.8.

La titulación de los sueros se mencionan a continuación: los sueros preinmunes de ambas ratas no reaccionó con las células infectadas, por lo cual ninguno de los animales presentaba anticuerpos contra RV, los sueros hiperinmunes de la 4^o y 5^o inmunización de ambas ratas reaccionaron a las células infectadas con un título de $\geq 1:102,400$ (Fig. 25 A y B).

Todos los sueros anti-NSP3 obtenidos después de la inmunización reaccionaron con las células infectadas por RV debido al reconocimiento de la proteína NSP3 alcanzando títulos altos. El análisis de los diferentes títulos mostró que la dilución adecuada para trabajar con estos sueros se ubica entre 1:6,400 y 1:25,600.

Titulación del suero hiperinmune anti-NSP3 por inmunofluorescencia

Se probó el suero hiperinmune de la 4^o y la 5^o inmunización obtenido de cada rata, el ensayo se realizó en células BSC-1 infectadas con RV SA11 con una M.O.I. de 0.8.

La titulación de los sueros hiperinmune fueron: el suero de la 4^o inmunización de la rata 1 alcanzó un título de $\geq 1:128,000$, mientras el suero de la 5^o inmunización presento un título de $\approx 1:64,000$. Con respecto a la rata 2 ambos sueros de la 4^o y 5^o inmunización alcanzaron un título de $\geq 1:128:000$ (Fig. 26).

De igual forma que en el ensayo de inmunoperoxidasa, todos los sueros anti-NSP3 reaccionaron con la proteína NSP3 del RV SA11. En esta técnica se recomienda el uso del suero hiperinmune anti-NSP3 a una dilución de 1:8000.

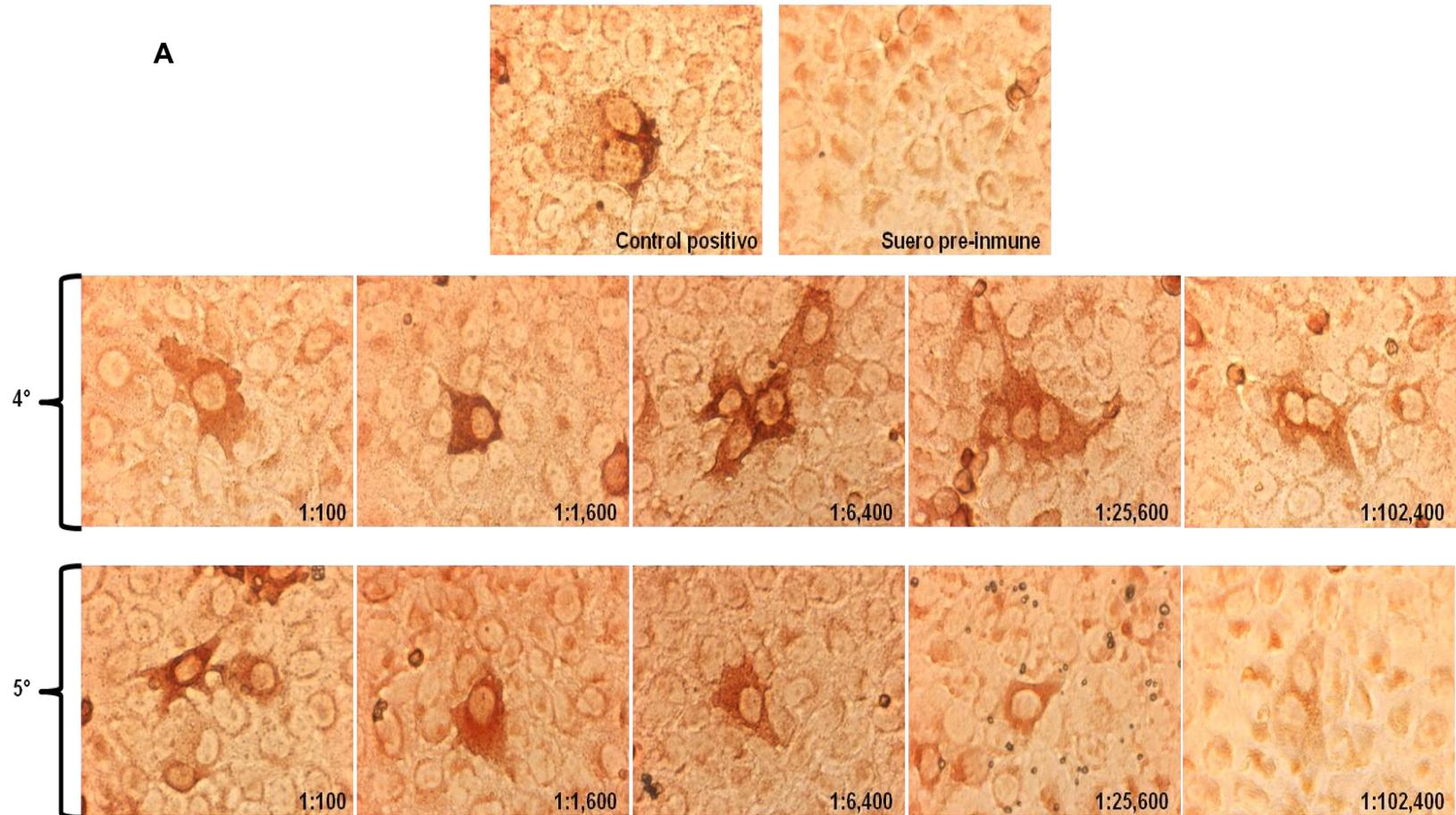


Figura 25. A) Células MA104 infectadas con RV SA11. Detección de las células infectadas con RV utilizando diferentes diluciones de los sueros hiperinmune anti-NPS3 de la 4° y 5° inmunización de la Rata 1. El suero preinmune de la rata 1 fue utilizado a 1:100. El control positivo es el anticuerpo RαR contra RV utilizado a 1:200.

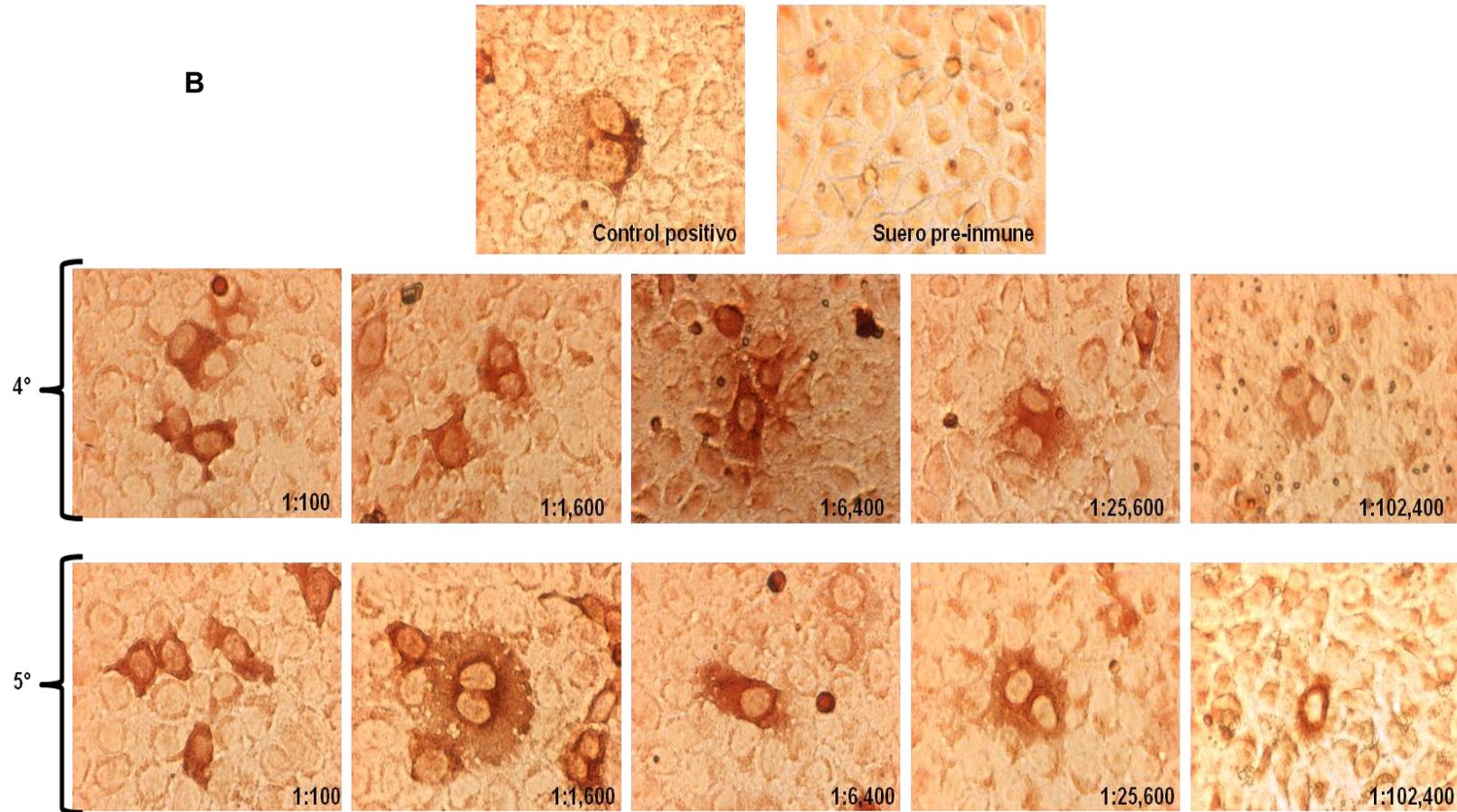


Figura 25. B) Células MA104 infectadas con RV SA11. Detección de las células infectadas con RV utilizando diferentes diluciones de los sueros hiperinmune anti-NPS3 de la 4° y 5° inmunización de la rata 2. El suero preinmune de la rata 2 fue utilizado a 1:100. El control positivo es un anticuerpo RαR contra RV utilizado a 1:200.

Detección de la proteína NSP3 por Western blot con el suero hiperinmune

Se probaron los cuatro sueros hiperinmunes en un ensayo de Western blot para detectar a la proteína NSP3 en células BSC-1 infectadas con RV SA11, RRV o sin infectar. Los sueros de la rata 1 se utilizaron para las células BSC-1 que fueron cosechadas a las 6 horas postinfección y los sueros de la rata 2 se utilizaron para células BSC-1 cosechadas a las 9 horas postinfección. Todos los sueros hiperinmunes se utilizaron a una dilución de 1:20,000 (Fig. 27).

De la misma manera que las técnicas anteriores, los sueros hiperinmunes reaccionaron con la proteína NSP3 de los RV SA11 y RRV, mientras las células que no fueron infectadas no dieron ninguna señal. Esto indica la especificidad de los sueros contra dicha proteína.

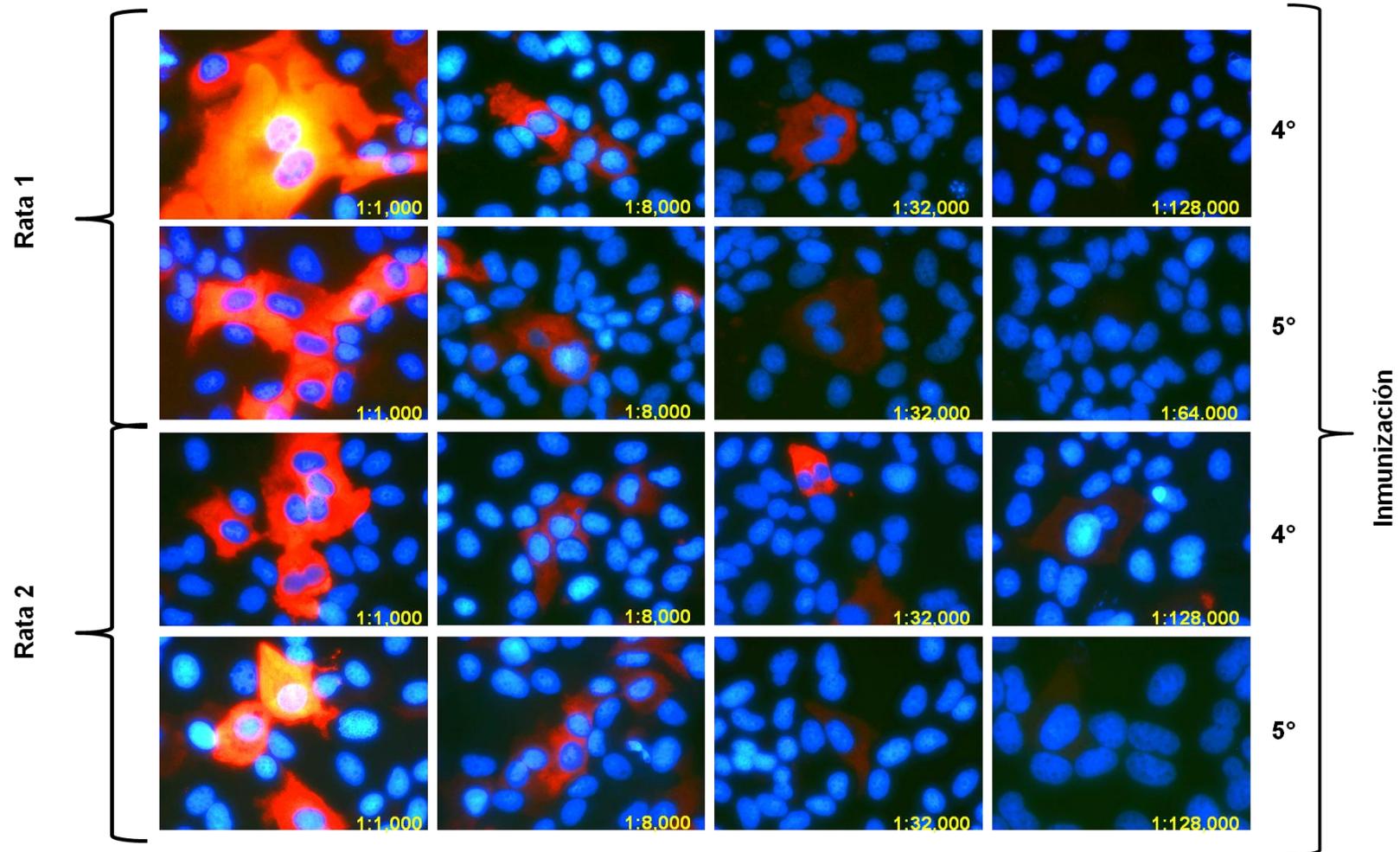


Figura 26. Inmunofluorescencia de células BSC-1 infectadas con RV SA11. Se muestra la detección de la proteína NSP3 usando los diferentes sueros hiperinmunes contra NSP3. Se fijaron las células 16 horas postinfección. Se presentan los núcleos teñidos con DAPI (color azul), y la distribución intracelular de NSP3 (color rojo). Los números de color amarillo indican la dilución utilizada del suero hiperinmune.

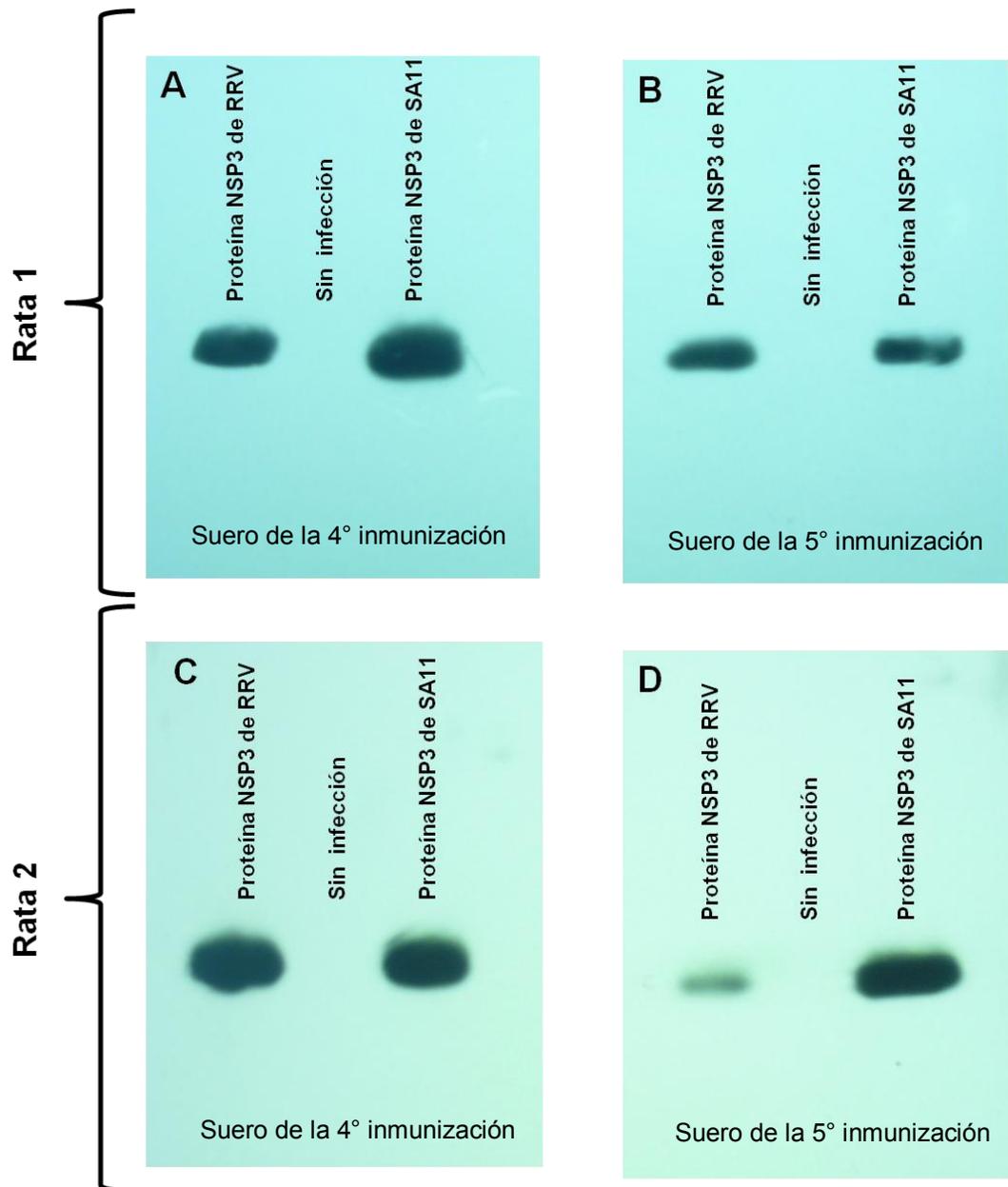


Figura 27. Western blot de los cuatro sueros hiperinmune a una dilución 1:20,000 para detectar la proteína NSP3 en células BSC-1 infectadas con SA11, RRV de RV o sin infectar. La figura A y B muestran los sueros hiperinmunes de la rata 1. La figura C y D muestran los sueros hiperinmunes de la rata 2.

Los sueros anti-NSP3 reconocieron eficientemente a esta proteína, tanto de la cepas RV SA11 y RRV.

Discusión

RV fue identificado como agente etiológico de diarrea severa en niños menores de 5 años, cuando la Dra. Ruth Bishop encontró el virus en biopsias de intestino delgado hace aproximadamente 37 años. RV es considerado el principal agente causante de diarreas severas en países desarrollados y en desarrollo de origen no bacteriano (Estes y Kapikian 2007; Carter y Saunders 2007). Desde entonces se han realizado varios estudios sobre RV, por lo cual hemos tenido un gran avance en el conocimiento de su ciclo replicativo, pero aún quedan etapas que se desconocen.

Por esta razón se necesitan aún más estudio sobre RV para tener un mayor conocimiento que nos permitiría identificar los puntos de regulación del ciclo replicativo, lo que es esencial para poder manipularlo. Pero antes se deben de desarrollar las herramientas necesarias, por lo cual nos dimos a la tarea de trabajar con dos proteínas virales de suma importancia para el ciclo viral de RV. La proteína estructural VP2, que participa en el proceso de replicación del genoma viral y la proteína no estructural NSP3 que es un regulador en el proceso de traducción en proteínas virales como celulares.

Para la clonación del segmento 2 primero se propagó en células MA104. La cepa SA11 fue genotipificada por electroforesis en un gel de poliacrilamida donde se observó que este virus presentaba dobletes en los segmentos 1, 2, 4 y 6, los cuales fueron más evidentes en el último pase (P3). Este fenómeno podría deberse a una contaminación de nuestra cepa con alguna otra que se maneje en el laboratorio o que presentara una población genéticamente heterogénea, ya que no partimos de virus semilla clonado. Se ha reportado que los segmentos de la cepa SA11 pueden presentar algunas variaciones en la migración en geles de poliacrilamida debido a que esta cepa presenta una

heterogeneidad genómica (Pereira et al 1983; Pereira et al 1984). El diseño de los oligonucleótidos para amplificar y secuenciar el segmento genómico 2 fue realizado tomando como referencia la secuencia del segmento 2 de RV SA11 del laboratorio de la Dra. Estes denominado Cl.3 ("Estes Cl.3"), registrada en el Genebank. Obtenida la secuencia del gene 2 de SA11 producido en nuestro laboratorio, se comparó con otras del gene 2 SA11. La secuencia "Estes Cl.3" tuvo una identidad del 98%, difiriendo en 29 nucleótidos y en la falta de un codón, mientras que la secuencia "Patton" presentó un 99% de identidad con solo un nucleótido diferente, pero éste se encuentra al inicio de un codón por lo cual modificó la lectura. Así la secuenciación demostró que clonamos un segmento 2 auténtico del RV SA11 que es prácticamente idéntico a la cepa "Patton". Esta casi identidad es explicable por el origen de las cepas, ya que obtuvimos nuestra cepa del laboratorio del Dr. H. Greenberg, la cual había sido obtenida previamente de los Institutos Nacionales de Salud, E.U.A., donde labora el Dr. J. Patton. A pesar de la similitud de nuestra cepa de SA11 con la de el Dr. Patton, el nucleótido en el que difieren estas cepas se da al inicio de un codón que modificó el aa 806, serina por prolina. Debido a que secuenciamos el segmento genómico de VP2 de SA11 presente en una sola clona bacteriana, no sabemos a cuál de las dos bandas del segmento genómico 2 corresponde, si a la mayoritaria o la minoritaria. Por esta razón desconocemos en cuantos nucleótidos difieren las dos bandas, aunque se ha reportado que la sustitución de un solo nucleótido puede alterar la migración de los segmentos (Dunn et al 1993).

Al comparar de manera exhaustiva la secuencia de aa del gene de VP2 de nuestra cepa de RV SA11 con otras cien del segmento genómico 2 de rotavirus del grupo A reportadas en el Genebank, observamos que el cambio en el aa 806 (serina por prolina) que se da en nuestra cepa de SA11 es la única que la presenta, porque en las demás secuencias

conservan dicho residuo como serina, por lo que consideramos que el segmento de nuestra cepa sufrió una mutación en relación a la secuencia consenso de las demás cepas. McClain (2010) en un estudio de estructura por cristalografía de rayos X de la proteína VP2 de la cepa UK de RV, indica que el residuo serina se ubica como el primer residuo de una alfa hélice. La ubicación de la prolina 806 en VP2, de nuestra cepa de SA11, en la interfase de una asa con una alfa hélice, indica que esta prolina formará parte de la asa en la estructura tridimensional de la proteína, por lo que esta mutación muy probablemente no afecte la estructura de la molécula, siendo posiblemente irrelevante.

Se logró clonar y expresar a la proteína rVP2 de SA11 en las cepas de *E. coli* BL21 (DE3) y BL21 (DE3) pPRIL. Al analizar el nivel de expresión de rVP2 en geles de poliacrilamida desnaturizantes teñidos con azul de Coomassie, sólo se detectó en la cepa BL21 (DE3) pPRIL, sin embargo por Western blot se demostró que en BL21 (DE3) se produce muy poca proteína, aproximadamente 19 veces menos que en BL21 (DE3) pPRIL, pero sí es detectable. Debido a que la diferencia entre ambas cepas bacterianas es que pPRIL tiene genes de RNA de transferencia (tRNA) poco frecuentes en bacterias, pero comunes en células de mamíferos, concluimos que el uso de estos codones en el gene de VP2 del RV SA11 que son poco frecuentes en *E. coli* es la razón del bajo nivel de expresión de BL21 (DE3).

Se detectó la proteína rVP2 y la proteína VP2 de la cepa RRV y SA11 de RV mediante un ensayo de Western blot, usando un AMC contra VP2. Así es evidente que ambas cepas de RV consideran el epítipo reconocido por el AMC en VP2. En la cepa BL21 (DE3) pPRIL gracias a que se produce rVP2 en forma abundante se observa una aparente degradación de la proteína de interés, como es evidente por un barrido de bandas de

menor peso molecular que VP2. Es interesante que el Western blot también detecta degradación de VP2 en células eucariontes infectadas con el rotavirus RRV. Aunque no sabemos si la degradación ocurrió *in vivo* o después de la lisis celular en las células eucariontes infectadas con RRV, el Western blot es una técnica adecuada para analizar la posible ocurrencia de degradación intracelular en VP2. Sería interesante usar el ensayo de Western blot desarrollado en este estudio para VP2 de RV, con el fin de determinar si en células infectadas con RV ocurre un procesamiento proteolítico de VP2, para identificar posibles isoformas de esta proteína.

Debido a que aparentemente la mutación de serina (806) a prolina no es relevante para la estructura tridimensional de VP2 de RV, esperamos que la proteína rVP2 conserve su antigenicidad, y sea apropiada para obtener un suero hiperinmune. En este estudio no continuamos con este objetivo debido a que simultáneamente a la clonación y expresión del gene de VP2, habíamos iniciado la expresión del gene de NSP3 de RV, partiendo del gene 7 del Rv SA11, previamente clonado en el laboratorio.

La proteína recombinante NSP3 fue utilizada para producir un suero hiperinmune, en base al segmento 7 del RV SA11 que fue previamente clonado en el vector de expresión procariótico pET28b(+). El plásmido recombinante pET28b-SA11-7 fue introducido en bacterias *E. coli* BL21 (DE3) y se observó que NSP3 recombinante se expresó en bacterias inducidas y no inducidas que contienen el plásmido recombinante. La expresión en bacterias no inducidas podría deberse a una mutación en el gen operador y/o represor del operón lactosa provocando un cambio en la regulación (Jacob y Monod 1961; Willson et al 1964), dicho fenómeno no fue estudiado debido a que nuestro interés era solamente producir rNSP3.

Se purificó a rNSP3 mediante cromatografía de afinidad usando Agarosa-Níquel en condiciones desnaturalizantes (8M urea), ya que fue insoluble. La cola de histidinas presente en el extremo carboxilo se une al níquel permitiendo su retención, para poder separarla se uso imidazol que compite con las histidinas para unirse al níquel, de esta manera se obtuvo a rNSP3. La pureza de dicha proteína fue de 87.35%, y a pesar que la muestra lleva otras proteínas, posiblemente bacterianas, el grado de pureza pareció apropiado para producir un suero hiperinmune que detectará específicamente a esta proteína en el contexto de células eucariontes.

Los sueros preinmunes obtenidos de las dos ratas no reaccionaron con las células infectadas por RV, esto indica que los animales no contienen anticuerpos contra el virus. Los animales se inmunizaron aplicando una dosis de rNSP3 (200 µg/dosis) cada 15 días. Se obtuvieron los sueros hiperinmunes de la 4° y 5° inmunización, se probó su especificidad y se titularon mediante la detección de la proteína NSP3 en células infectadas con RV SA11 y RRV. En la técnica de inmunoperoxidasa todos los sueros reaccionaron con las células MA104 infectadas con RV SA11 obteniendo un título máximo para todos los sueros de $\geq 1:102,400$. La dilución estándar para trabajos posteriores con esta técnica y estos sueros, se ubicó entre 1:6,400 y 1:25,400.

En la técnica de inmunofluorescencia, todos los sueros detectaron a la proteína NSP3 mostrando su distribución intracelular en células BSC-1 infectadas con RV SA11, obteniendo un título máximo de $\geq 1:128,000$, excepto el suero hiperinmune de la 5° inmunización de la rata 2 con un título máximo de $\geq 1:64,000$. En base a estos resultados recomendamos el uso de una dilución para inmunofluorescencia de 1:8,000.

Otra técnica que se utilizó para verificar la especificidad de los sueros hiperinmune fue un ensayo de Western blot, en esta técnica solo se usó una dilución de los sueros que fue de 1:20.000. Los sueros reaccionaron con la proteína NSP3 de las cepas SA11 y RRV de RV en células BSC-1 infectadas, sin detectar ninguna proteína en células BSC-1 no infectadas. Concluimos que los sueros anti-NSP3 son específicos para reconocer esta proteína por Western blot.

En general, los sueros hiperinmunes obtenidos de ambas ratas presentan una especificidad contra la proteína NSP3 reconociéndola en condiciones nativas (immunoperoxidasa e inmunofluorescencia) y desnaturalizada (Western blot).

En conjunto, se logró la clonación y expresión del gene de VP2 del RV SA11, así como la producción de NSP3 del RV SA11 en bacterias, su purificación y uso para producir sueros hiperinmunes, mismos que fueron caracterizados para ser usados en diversas técnicas que permiten detectar a esta proteína con alta sensibilidad y especificidad. Así en el transcurso de la tesis se logro transitar a partir del conocimiento de la secuencia del gene de VP2 de RV a la producción de la proteína recombinante y a la detección con anticuerpos específicos contra ésta. En el desarrollo de este trabajo se realizaron hallazgos inesperados, como la presencia de dobles segmentos genómicos del gene 2 de la cepa de RV SA11, la identificación de una mutación en un aa de VP2 de la cepa local del RV SA11 que no está presente en el gene de VP2 de ninguna otra cepa conocida de RV, y la posible presencia de una mutación en los genes del represor o el operador de lactosa en el plásmido en el que expresamos al gene de NSP3, que inactiva al sistema de regulación de la expresión.

Sin duda, la rVP2 del RV SA11 y los anticuerpos anti-NSP3 generados serán de gran utilidad para el estudio de las funciones de estas proteínas de RV.

Conclusiones

- Se obtuvo el cDNA del segmento 2 del RV SA11.
- Se clonó el segmento 2 del RV SA11 en el vector de expresión procarionte pET28b(+), nombrando esta construcción como pET28b-SA11-2.
- Se expresó la proteína recombinante VP2 en bacterias *E. coli*, obteniendo un mayor expresión de la proteína en la cepa BL21 (DE3) pPRIL.
- La clona 2 del RV SA11 del laboratorio presentó un cambio de aa que la hace diferente en relación a las otras cepas de RV del grupo A.
- La proteína recombinante fue reconocida por un AMC, lo cual nos indica que conserva los epítomos de la proteína VP2, por esta razón rVP2 podrá ser usada para la producción de un suero hiperinmune.
- Se debe probar distintas condiciones de temperatura, concentración de IPTG y tiempo de incubación para mejorar la expresión y disminuir la degradación de VP2 recombinante.
- Se recomienda secuenciar la clona 2 de *E. coli* XL-Blue para observar si la sustitución del nucleótido persiste y/u obtener clones virales a partir de la población heterogénea de la cepa SA11-P-3 para realizar estudios de genotipificación y secuenciación.

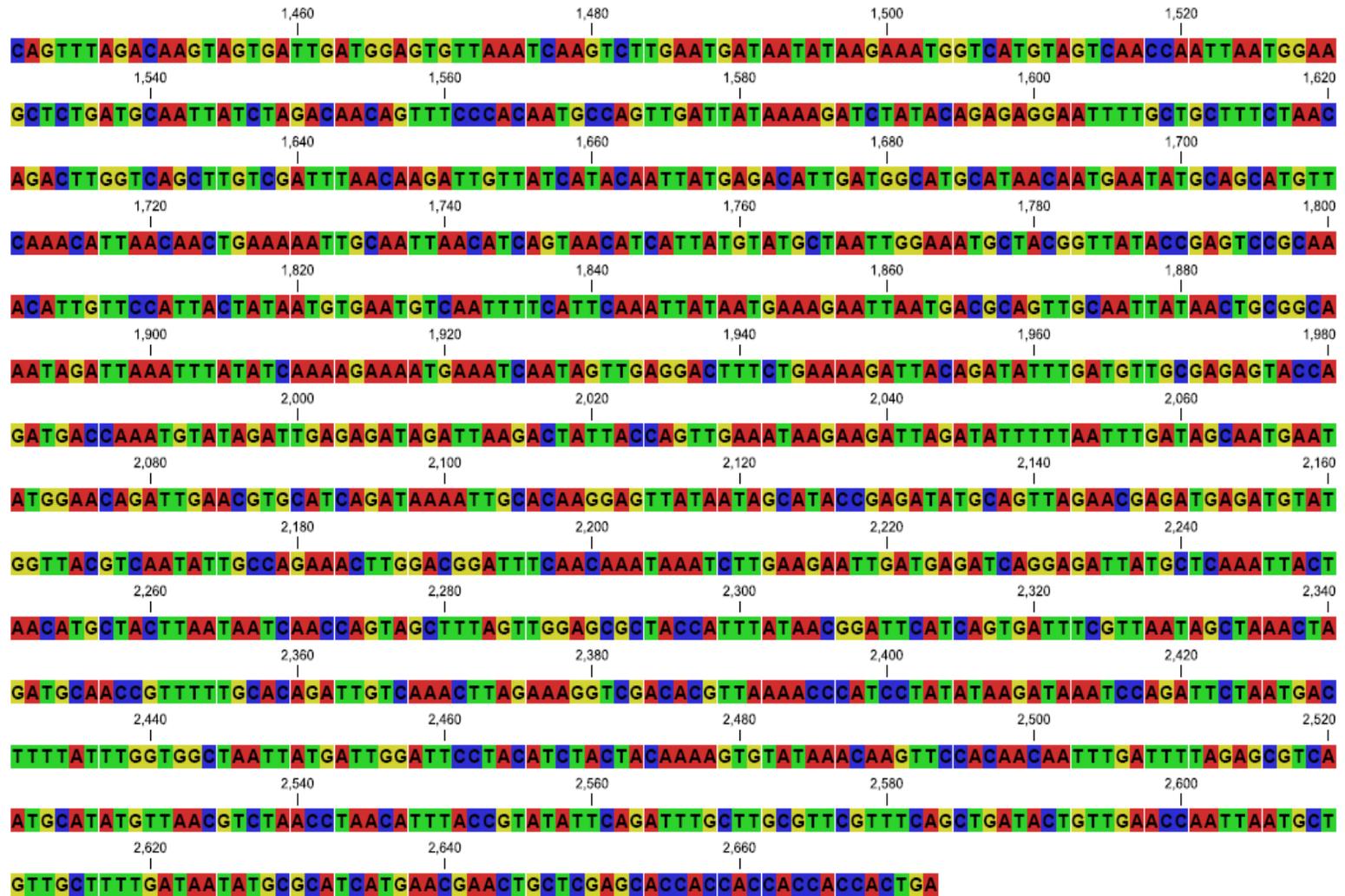
- Se expresó la proteína recombinante de NSP3 en bacterias *E. coli* BL21 (DE3).
- Se purificó a NSP3 recombinante mediante cromatografía de afinidad.
- Se produjeron sueros hiperinmunes contra NSP3.
- Todos los sueros hiperinmunes reaccionaron contra la proteína NSP3 de RV SA11 y RRV en forma específica y con alta sensibilidad.
- Los sueros hiperinmunes fueron estandarizados para cada técnica en las que fueron probados.
- Los sueros hiperinmunes reconocieron la proteína NSP3 tanto en forma desnaturalizada como nativa.

Anexo

Secuencia del segmento 2 del RV SA11 clonado en vector pET28b(+) correspondiente a la clona 1 de la cepa bacteriana *E. coli* XL-Blue.

```

      20          40          60          80
ATGGCGTATCGAAAACGTGGAGCGCGTCGTGAGACGAATCTAAACAAAGATGAACGAATGCAAGAAAAAGAAGATAGCAAGAACA TTAAT
    100          120          140          160          180
AATGACAGTCCCTAAATCACAAATTATCAGAAAAAGTATTATCTAAGAAA GAA GAGAT AATTACAGATAATCAAGGAAGAAGTTAAGATATCT
    200          220          240          260          280          300          320          340          360
GATGAGGTAAAAAAATCTAATAAAGAA GAATCGAAACAGTTGTTAGAACTA CTTAA AACAAAAGAGGAACATCAAAAAGAAGTTCAGTAT
    380          400          420          440          460          480          500          520          540
GAAATA TTACAAAAAACTATCCCTACA TTTGAACC AAAAGAGTCAATACTC AAAAAATTAGAAGACATAAAA CCAGAACAAGCAAAGAAA
    560          580          600          620          640          660          680          700          720
CAAAC TAAACTGTTTCGAATATTTGAA CCGAAACAATTGCCTATTTATAGAGCTAA TGGAGAAA GAGAGCTTCGTAATAGATGGTATTGG
    740          760          780          800          820          840          860          880          900
AAATTGAAACGAGATACTCTTCCTGATGGAGATTATGATGTTAGAGAGTATTTTTT AAATTTATATGATCAAGTATT AATGGAAA TGCCG
    920          940          960          980          1,000          1,020          1,040          1,060          1,080
GATTATCTATTACTTAAAGATA TGGCTGTAGAGAA TAAAAATTCAAGGGATGCTGGCAAAGTAGTTGATTCTGAAACAGCCGCAATATGC
    1,100          1,120          1,140          1,160          1,180          1,200          1,220          1,240          1,260
GATGCTATTTTTCAAGATGAAGAAACC GAAGGTGCAGTAAGAAGATTCA TAGCTGAGATGAGAC AACGAGTTC AAGCTGATCGAAATGTA
    1,280          1,300          1,320          1,340          1,360          1,380          1,400          1,420          1,440
GTCAATTATCCATCTATATTGCATCCAATTGACCA TGCCTTAAACGAATAC TTCTTACAACATCAGTTGGTAGAACCATT AAATAATGAT
    1,460          1,480          1,500          1,520          1,540          1,560          1,580          1,600          1,620
ATCATTTC AATTACATAGCCAGAGAGAATAAGAAA TGATGTCAACTATATA TTAATAATGGACA GGAATTTA CCGTCTACTGCTAGATAT
    1,640          1,660          1,680          1,700          1,720          1,740          1,760          1,780          1,800
ATCAGACCAAACCTTGCTAG AAGATAGGTTAAATTTACATGATAATTTT GAGTCACTCTGGGATACTATAACTACATCTAA TTATA TTTTA
    1,820          1,840          1,860          1,880          1,900          1,920          1,940          1,960          1,980
GCAAGATCTGTGGTGCCAGACC TAAAAGAATTAGTATCTACTGAGGCA CAAATCCAGAAAATGTCACAAGATTTGCAATTGGAAGCTTTG
    2,000          2,020          2,040          2,060          2,080          2,100          2,120          2,140          2,160
ACAATACAATCAGAGACTCAGTTTTTAAACAGGTATAAACTCAC AAGCGCTAATGATTTGTTTTAAAAC TTTGATTGCTGCTATGTTGAGT
    2,180          2,200          2,220          2,240          2,260          2,280          2,300          2,320          2,340
CAGAGAACCATGTCATTAGATTTTCGTAACGACAAA TTACATGTCACTTATTT CAGGCATGTGGTTACTCACTGTGATTCC AAATGATATG
    2,360          2,380          2,400          2,420          2,440          2,460          2,480          2,500          2,520
TTTATAAGAGAATCATTAGTAGCATGTCAACTAGCCATAATAAATACGATTGTTTATCCGGCATTCCGGAATGCAAAGAA TGCAATTATAGG
    2,540          2,560          2,580          2,600          2,620          2,640          2,660          2,680          2,700
AATGGTGATCCACAGACTCCCTTTCAAATTGCAGAGCAACAGATTCAA AATTTTCAGGTAGCTAATTGGTTACATTTTGTTAATTATAAT
  
```



Referencias.

- Angel, J., M. A. Franco, y H. B. Greenberg. 2008. Rotaviruses. En B. W. J. Mahy and M. H. V. Van Regenmortel (Eds), *Encyclopedia of Virology* (pp. 507-514). 3 ed., Academic Press.
- Arias, C. F., C. A. Guerrero, E. Mendez, S. Zarate, P. Isa, R. Espinosa, P. Romero, y S. Lopez. 2001. Early events of rotavirus infection: the search for the receptor(s). *Novartis Found Symp* 238:47-60; discussion 60-43.
- Arias, C. F., P. Isa, C. A. Guerrero, E. Mendez, S. Zarate, T. Lopez, R. Espinosa, P. Romero, y S. Lopez. 2002. Molecular biology of rotavirus cell entry. *Arch Med Res* 33 (4):356-361.
- Attoui, H., y P. Mertens. 2007. Template for Taxonomic Proposal to the ICTV Executive Committee. To create a new SubFamily in an existing Family. In *International Committee on Taxonomy of Viruses*, 1-9. Extraído el 18 de Junio del 2010 desde http://talk.ictvonline.org/files/ictv_official_taxonomy_updates_since_the_8th_report/m/v_vertebrate-2008/1221.aspx
- Benureau, Y., J. C. Huet, A. Charpilienne, D. Poncet, y J. Cohen. 2005. Trypsin is associated with the rotavirus capsid and is activated by solubilization of outer capsid proteins. *J Gen Virol* 86 (Pt 11):3143-3151.
- Berois, M., C. Sapin, I. Erk, D. Poncet, y J. Cohen. 2003. Rotavirus nonstructural protein NSP5 interacts with major core protein VP2. *J Virol* 77 (3):1757-1763.
- Bican, P., J. Cohen, A. Charpilienne, y R. Scherrer. 1982. Purification and characterization of bovine rotavirus cores. *J Virol* 43 (3):1113-1117.
- Boyle, J. F., y K. V. Holmes. 1986. RNA-binding proteins of bovine rotavirus. *J Virol* 58 (2):561-568.
- Campagna, M., C. Eichwald, F. Vascotto, y O. R. Burrone. 2005. RNA interference of rotavirus segment 11 mRNA reveals the essential role of NSP5 in the virus replicative cycle. *J Gen Virol* 86 (Pt 5):1481-147.
- Carter, J. B., y V. A. Saunders. 2007. Reoviruses (and other dsRNA viruses). En J. B. Carter and V. A. Saunders (Eds). *Virology: Principles and Applications*, (pp. 147-156). John Wiley and Sons, Ltd., Inglaterra.
- Ciarlet, M., y 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 (Pt 4):943-948.

- Ciarlet, M., J. E. Ludert, M. Iturriza-Gomara, F. Liprandi, J. J. Gray, U. Desselberger, y M. K. Estes. 2002. Initial interaction of rotavirus strains with N-acetylneuraminic (sialic) acid residues on the cell surface correlates with VP4 genotype, not species of origin. *J Virol* 76 (8):4087-4095.
- Clark, B., y U. Desselberger. 1988. Myristylation of rotavirus proteins. *J Gen Virol* 69 (Pt 10):2681-2686.
- Contin, R., F. Arnoldi, M. Campagna, y O. R. Burrone. 2010. Rotavirus NSP5 orchestrates recruitment of viroplasmic proteins. *J Gen Virol*.
- Cook, N., J. Bridger, K. Kendall, M. I. Gomara, L. El-Attar, y J. Gray. 2004. The zoonotic potential of rotavirus. *J Infect* 48 (4):289-302.
- Charpilienne, A., J. Lepault, F. Rey, y J. Cohen. 2002. Identification of rotavirus VP6 residues located at the interface with VP2 that are essential for capsid assembly and transcriptase activity. *J Virol* 76 (15):7822-7831.
- Chemello, M. E., O. C. Aristimuno, F. Michelangeli, y M. C. Ruiz. 2002. Requirement for vacuolar H⁺-ATPase activity and Ca²⁺ gradient during entry of rotavirus into MA104 cells. *J Virol* 76 (24):13083-13087.
- Chwetzoff, S., y G. Trugnan. 2006. Rotavirus assembly: an alternative model that utilizes an atypical trafficking pathway. *Curr Top Microbiol Immunol* 309:245-261.
- Delmas, O., A. M. Durand-Schneider, J. Cohen, O. Colard, y G. Trugnan. 2004. Spike protein VP4 assembly with maturing rotavirus requires a postendoplasmic reticulum event in polarized caco-2 cells. *J Virol* 78 (20):10987-10994.
- Deo, R. C., C. M. Groft, K. R. Rajashankar, y S. K. Burley. 2002. Recognition of the rotavirus mRNA 3' consensus by an asymmetric NSP3 homodimer. *Cell* 108 (1):71-81.
- Desselberger, U., y J. Gray. 2009. Rotaviruses. En A. J. Zuckerman, J. E. Banatvala, B. D. Schoub, G. P. D. and P. Mortiner (Eds). *Principles and Practice of Clinical Virology* (pp. 337-353). 6 ed. John Willey and Sons Ltd., Inglaterra.
- Dunn, S. J., R. L. Ward, M. M. McNeal, T. L. Cross, y H. B. Greenberg. 1993. Identification of a new neutralization epitope on VP7 of human serotype 2 rotavirus and evidence for electropherotype differences caused by single nucleotide substitutions. *Virology* 197 (1):397-404.
- Estes, M., y A. Kapikian. 2007. Rotaviruses. En D. M. H. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman y S. E. Straus (Eds). *Field Virology* (pp.1917-1974). 5 ed. Vol. 2 Lippincott Williams and Wilkins, Filadelfia, EUA.
- Estes, M. K., and J. Cohen. 1989. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol Rev* 53 (4):410-449.

- Fabbretti, E., I. Afrikanova, F. Vascotto, y O. R. Burrone. 1999. Two non-structural rotavirus proteins, NSP2 and NSP5, form viroplasm-like structures in vivo. *J Gen Virol* 80 (Pt 2):333-339.
- Fauquet, C. M., M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, y L. A. Ball. 2005. Genus Rotavirus. En C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger and L. A. Ball. *Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (pp. 484-496). Elsevier, San Diego, CA, USA.
- Gray, J., T. Vesikari, P. Van Damme, C. Giaquinto, J. Mrukowicz, A. Guarino, R. Dagan, H. Szajewska, y V. Usonis. 2008. Rotavirus. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 46 Suppl 2:S24-31.
- Harb, M., M. M. Becker, D. Vitour, C. H. Baron, P. Vende, S. C. Brown, S. Bolte, S. T. Arold, y D. Poncet. 2008. Nuclear localization of cytoplasmic poly(A)-binding protein upon rotavirus infection involves the interaction of NSP3 with eIF4G and RoXaN. *J Virol* 82 (22):11283-11293.
- Hoshino, Y., y A. Z. Kapikian. 2000. Rotavirus serotypes: classification and importance in epidemiology, immunity, and vaccine development. *J Health Popul Nutr* 18 (1):5-14.
- Isa, P., C. F. Arias, y S. Lopez. 2006. Role of sialic acids in rotavirus infection. *Glycoconj J* 23 (1-2):27-37.
- Jacob, F., y J. Monod. 1961. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J Mol Biol* 3:318-356.
- Jayaram, H., M. K. Estes, y B. V. Prasad. 2004. Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. *Virus Res* 101 (1):67-81.
- Jolly, C. L., B. M. Beisner, E. Ozser, y I. H. Holmes. 2001. Non-lytic extraction and characterisation of receptors for multiple strains of rotavirus. *Arch Virol* 146 (7):1307-1323.
- Kapikian, A. Z. 1993. Viral gastroenteritis. *JAMA* 269 (5):627-630.
- Labbe, M., P. Baudoux, A. Charpilienne, D. Poncet, y J. Cohen. 1994. Identification of the nucleic acid binding domain of the rotavirus VP2 protein. *J Gen Virol* 75 (Pt 12):3423-3430.
- Labbe, M., A. Charpilienne, S. E. Crawford, M. K. Estes, y J. Cohen. 1991. Expression of rotavirus VP2 produces empty corelike particles. *J Virol* 65 (6):2946-2952.
- Li, Z., M. L. Baker, W. Jiang, M. K. Estes, y B. V. V. Prasad. 2009. Rotavirus Architecture at Subnanometer Resolution *Journal of Virology* 83 (4):pp 1754-1766.

- Lopez, S., y C. F. Arias. 2004. Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. *Trends Microbiol* 12 (6):271-278.
- Lorrot, M., y M. Vasseur. 2007a. How do the rotavirus NSP4 and bacterial enterotoxins lead differently to diarrhea? *Virology* 4:31.
- ———. 2007b. [Physiopathology of Rotavirus diarrhea]. *Arch Pediatr* 14 Suppl 3:S145-151.
- Ludert, J. E., N. Feng, J. H. Yu, R. L. Broome, Y. Hoshino, y H. B. Greenberg. 1996. Genetic mapping indicates that VP4 is the rotavirus cell attachment protein in vitro and in vivo. *J Virol* 70 (1):487-493.
- Mansell, E. A., y J. T. Patton. 1990. Rotavirus RNA replication: VP2, but not VP6, is necessary for viral replicase activity. *J Virol* 64 (10):4988-4996.
- Mathieu, M., I. Petitpas, J. Navaza, J. Lepault, E. Kohli, P. Pothier, B. V. Prasad, J. Cohen, y F. A. Rey. 2001. Atomic structure of the major capsid protein of rotavirus: implications for the architecture of the virion. *EMBO J* 20 (7):1485-1497.
- Mattion, N. M., J. Cohen, C. Aponte, y M. K. Estes. 1992. Characterization of an oligomerization domain and RNA-binding properties on rotavirus nonstructural protein NS34. *Virology* 190 (1):68-83.
- McClain, B., E. Settembre, B. R. Temple, A. R. Bellamy, y S. C. Harrison. X-ray crystal structure of the rotavirus inner capsid particle at 3.8 Å resolution. *J Mol Biol* 397 (2):587-599.
- McDonald, S. M., y J. T. Patton. 2008. Molecular characterization of a subgroup specificity associated with the rotavirus inner capsid protein VP2. *J Virol* 82 (6):2752-2764.
- Montero, H., C. F. Arias, y S. Lopez. 2006. Rotavirus Nonstructural Protein NSP3 is not required for viral protein synthesis. *J Virol* 80 (18):9031-9038.
- Padilla-Noriega, L., O. Paniagua, y S. Guzman-Leon. 2002. Rotavirus protein NSP3 shuts off host cell protein synthesis. *Virology* 298 (1):1-7.
- Parashar, U. D., J. S. Bresee, J. R. Gentsch, y R. I. Glass. 1998. Rotavirus. *Emerg Infect Dis* 4 (4):561-570.
- Parashar, U. D., C. J. Gibson, J. S. Bresse, y R. I. Glass. 2006. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis* 12 (2):304-306.
- Patton, J. T. 2001. Rotavirus RNA replication and gene expression. *Novartis Found Symp* 238:64-77; discussion 77-81.

- Patton, J. T., M. T. Jones, A. N. Kalbach, Y. W. He, y J. Xiaobo. 1997. Rotavirus RNA polymerase requires the core shell protein to synthesize the double-stranded RNA genome. *J Virol* 71 (12):9618-9626.
- Patton, J. T., L. S. Silvestri, M. A. Tortorici, R. Vasquez-Del Carpio, y Z. F. Taraporewala. 2006. Rotavirus genome replication and morphogenesis: role of the viroplasm. *Curr Top Microbiol Immunol* 309:169-187.
- Pereira, H. G., R. S. Azeredo, A. M. Fialho, y M. N. Vidal. 1984. Genomic heterogeneity of simian rotavirus SA11. *J Gen Virol* 65 (Pt 4):815-818.
- Pereira, H. G., V. S. Gouvea, y A. M. Fialho. 1986. A comparison of simian rotavirus SA11 preparations maintained in different laboratories. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 81 (4):389-393.
- Pesavento, J. B., S. E. Crawford, M. K. Estes, y B. V. Prasad. 2006. Rotavirus proteins: structure and assembly. *Curr Top Microbiol Immunol* 309:189-219.
- Pesavento, J. B., J. A. Lawton, M. E. Estes, y B. V. Venkataram Prasad. 2001. The reversible condensation and expansion of the rotavirus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (4):1381-1386.
- Piron, M., T. Delaunay, J. Grosclaude, y D. Poncet. 1999. Identification of the RNA-binding, dimerization, and eIF4GI-binding domains of rotavirus nonstructural protein NSP3. *J Virol* 73 (7):5411-5421.
- Piron, M., P. Vende, J. Cohen, y D. Poncet. 1998. Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4GI and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F. *EMBO J* 17 (19):5811-5821.
- Poncet, D., C. Aponte, y J. Cohen. 1993. Rotavirus protein NSP3 (NS34) is bound to the 3' end consensus sequence of viral mRNAs in infected cells. *J Virol* 67 (6):3159-3165.
- Poncet, D., S. Laurent, y J. Cohen. 1994. Four nucleotides are the minimal requirement for RNA recognition by rotavirus non-structural protein NSP3. *EMBO J* 13 (17):4165-4173.
- Prasad, B. V., R. Rothnagel, C. Q. Zeng, J. Jakana, J. A. Lawton, W. Chiu, y M. K. Estes. 1996. Visualization of ordered genomic RNA and localization of transcriptional complexes in rotavirus. *Nature* 382 (6590):471-473.
- Rao, C. D., M. Das, P. Ilango, R. Lalwani, B. S. Rao, y K. Gowda. 1995. Comparative nucleotide and amino acid sequence analysis of the sequence-specific RNA-binding rotavirus nonstructural protein NSP3. *Virology* 207 (1):327-333.
- Shaw, R. D., y H. B. Greenberg. 1999. Rotaviruses (Reoviridae). En A. Granoff y R. G. Webster (Eds). *Encyclopedia of Virology* (pp. 1576-1592). 2 ed. Academic Press. San Diego, CA, USA.

- Suguna, K., y C. D. Rao. 2010. Rotavirus nonstructural proteins: a structural perspective. *Current Science* 98 (3):pp 352-359.
- Varani, G., y F. H. Allain. 2002. How a rotavirus hijacks the human protein synthesis machinery. *Nat Struct Biol* 9 (3):158-160.
- Vende, P., M. Piron, N. Castagne, y D. Poncet. 2000. Efficient translation of rotavirus mRNA requires simultaneous interaction of NSP3 with the eukaryotic translation initiation factor eIF4G and the mRNA 3' end. *J Virol* 74 (15):7064-7071.
- Vitour, D., P. Lindenbaum, P. Vende, M. M. Becker, y D. Poncet. 2004. RoXaN, a novel cellular protein containing TPR, LD, and zinc finger motifs, forms a ternary complex with eukaryotic initiation factor 4G and rotavirus NSP3. *J Virol* 78 (8):3851-3862.
- Wentz, M. J., J. T. Patton, y R. F. Ramig. 1996. The 3'-terminal consensus sequence of rotavirus mRNA is the minimal promoter of negative-strand RNA synthesis. *J Virol* 70 (11):7833-7841.
- Willson, C., D. Perrin, M. Cohn, F. Jacob, and J. Monod. 1964. Non-Inducible Mutants of the Regulator Gene in the "Lactose" System of Escherichia Coli. *J Mol Biol* 8:582-592.
- Zeng, C. Q., M. K. Estes, A. Charpilienne, y J. Cohen. 1998. The N terminus of rotavirus VP2 is necessary for encapsidation of VP1 and VP3. *J Virol* 72 (1):201-208.