



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**  
**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**EVALUACION DE LA CAPACIDAD DE UNION A GLICANOS**  
**DE LA PROTEINA VP8\*CORE DE DIFERENTES**  
**CEPAS DE ROTAVIRUS**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**Maestro en Ciencias**

PRESENTA:

**Q.F.B Cinthia Martínez Sánchez**

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Pavel Isa  
IBT-UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dr. Ramón González  
IBT-UNAM

Dr. Víctor Bustamante  
IBT-UNAM

**México D.F. Noviembre 2014**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## Comité Jurado

Presidente: Dr. Agustín López- Munguía Canales

Secretario: Dra. Liliana Pardo López

Vocal: Dr. Fernando Esquivel Guadarrama

Vocal: Dr. Ernesto Ortiz Suri

Vocal: Dr. Enrique Salas Vidal

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Virología del Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM, bajo la tutoría del **Dr. Pavel Isa**. Este proyecto se realizó con financiamiento de DGAPA-UNAM (IN207313). El alumno recibió una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) durante la realización de su proyecto de maestría (207313).

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Pavel Isa por darme la oportunidad de trabajar bajo su tutoría, por brindarme su apoyo, consejos y sobretodo su paciencia.

A los integrantes de mi comité tutorial por sus consejos y críticas durante la realización de la maestría.

A los integrantes del laboratorio CA/SL: Tomas López, Luis Casorla, Poncho y Yerli, por su compañerismo en el laboratorio.

Al Dr. Gustavo Martínez y Juanma por su amistad dentro y fuera del Instituto, ya que fueron un pilar en el desarrollo de mi maestría y vida, gracias por sus consejos, sus sonrisas, su apoyo, su sinceridad y calidez.

A la Biól. Erika Isabel Melchy Perez por su asesoría y ayuda en el uso del citómetro de flujo.

## **DEDICATORIA**

Dedico esta tesis a mis padres Héctor Martínez Cerquéda y Ana Edith Sánchez López por haberme educado, me siento muy orgullosa de lo que me he convertido gracias a sus consejos, sus regaños, sus enseñanzas, su paciencia y sobre todo por los valores y sentido de la vida, que me han dejado.

A mi hermana Binisa Tamara Martínez Sánchez y mi hermana postiza Diana Martínez Cerqueda por compartir la vida conmigo, compartir sueños, sonrisas, lágrimas frustraciones, y estar ahí en todo momento.

A mis mejores amigos esa segunda familia: Juanma por compartir el mismo tipo de locura que tanto disfrutamos. Roy Ortega por todos esos años compartidos y enseñarme el significado del amor. Frida por darme un hola hace 14 años en aquella banquita y seguir una amistad hasta el día de hoy. Ale de la Torre por ser mi ángel diabólico haciendo divertido todo a su paso. Eduardo Giles por ser mi yo en niño con mala suerte y mi amigo bipolar favorito. David Arceo por enseñarme la sensibilidad y maravilla del mundo, gracias por tu poesía, tu música, tu amor. Mis amigos eternos (Kama, Farra, Mario, Rata) por todos esos momentos de verdadera amistad. Mis queridos roomies (Elías, Laura, Flor, Cherry) por darme un hogar cálido, por esas cenas, platicas y apoyo incondicional. Mis amiguitos peques (Pablo, Cezar, Marco, Chio, Karen, Vale, David) por darme esos toques de juventud y diversión necesarias para vivir.

A mi novio Jaén por ser mi amigo y pareja, por escucharme, hacerme reír y hacer de mi mundo un lugar simple y especial a su lado, por enseñarme las diferentes formas en que se puede amar.

A la vida y a todas aquellas personas que me han influenciado para ser una mejor persona día a día.

## INDICE

INDICE .....	II
RESUMEN.....	IV
<b>1. INTRODUCCION.....</b>	<b>1</b>
1.1 Rotavirus: Generalidades y Estructura .....	1
1.2 Clasificación .....	4
1.3 Proteínas de la capa externa de rotavirus .....	4
1.3.1 Proteína VP7.....	4
1.3.2 Proteína VP4.....	5
1.4 Unión y entrada.....	7
<b>2. ANTECEDENTES .....</b>	<b>10</b>
2.1 Ácidos siálicos como receptores de rotavirus.....	10
2.2 Gangliósidos como receptores de rotavirus .....	11
2.3 Grupos antigénicos de Histocompatibilidad (HBGAs) como receptores de rotavirus .....	14
<b>3. HIPÓTESIS .....</b>	<b>18</b>
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>18</b>
4.1 Objetivo General .....	18
4.2 Objetivos particulares.....	18
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>19</b>
5.1 Cultivo celular y virus .....	19
5.2 Obtención de las proteínas GST-VP8*core .....	21
5.2.1 Extracción del RNA viral.....	21
5.2.2 Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) ....	21
5.2.3 Clonación .....	22
5.2.4 PCR de colonia .....	23
5.2.5 Expresión de la proteína recombinante GST-VP8*core.....	24
5.2.6 Purificación de la proteína recombinante GST-VP8*core .....	24
5.2.7 Detección y cuantificación de proteínas recombinantes. ....	25
5.3 Comparación de las secuencias VP8*core.....	25
5.4 Ensayos de Hemaglutinación de la proteína recombinante GST-VP8*core con eritrocitos de tipo sanguíneo A, B y O. ....	26

5.5 Ensayos de bloqueo de la infectividad con la proteína recombinante GST-VP8*core .....	26
5.6 Ensayos de unión a células MA104 utilizando Citometría de Flujo .....	27
5.7 Screening de glicanos para las proteínas GST-VP8*core .....	27
<b>6. RESULTADOS</b> .....	<b>28</b>
6.1 Obtención de proteínas recombinantes GST-VP8*core de 9 cepas diferentes de rotavirus. ....	28
6.1.1 Clonación de VP8*core de diferentes cepas de rotavirus. ....	28
6.1.2 Verificación de la secuencia de rotavirus clonada. ....	29
6.1.3 Expresión y purificación de proteínas recombinantes. ....	33
6.2 Ensayos de Hemaglutinación con eritrocitos de tipo A, B y O. ....	33
6.3 Ensayos de unión a células MA104 utilizando Citometría de Flujo .....	37
6.4 Bloqueo de la infectividad con la proteína recombinante GST-VP8*core .....	40
6.5 Interacción de la proteína recombinante GST-VP8*core con un panel de glicanos. ....	45
<b>7. DISCUSIÓN</b> .....	<b>52</b>
<b>8. CONCLUSIONES</b> .....	<b>61</b>
<b>10. REFERENCIAS</b> .....	<b>63</b>

## RESUMEN

Entender la entrada de rotavirus a las células e identificar los receptores que utiliza para unirse a ella es particularmente relevante debido a que rotavirus es un importante patógeno y poder contrarrestar su unión y entrada sería de gran impacto clínico y económico.

La proteína VP4 es clave en las interacciones tempranas del virus con su célula huésped, tiene un peso molecular de 88 KDa y es procesada proteolíticamente por tripsina originando dos proteínas: VP5\* (60KDa) localizada hacia el extremo carboxilo terminal de VP4 y VP8\* (28KDa) localizada hacia el extremo amino terminal de VP4 [López y Arias, 1981]. La proteína VP8\* está compuesta de 231 aminoácidos, contiene un core proteasa-resistente (residuos A46 al R231) [Dormitzer, 2001]. El core contiene un puente disulfuro entre las cisteínas 203 y 216, una región hipervariable (aa 72 - 203) y una región de hemaglutinación (HA) presente del aa 93 al 208 [Fuentes-Panana et al, 1995].

Este trabajo se enfocó en evaluar la capacidad de rotavirus de unir a glicanos a través de su proteína VP8\*core. Para este objetivo se clonó, expresó y purificó la proteína recombinante GST-VP8\*core que corresponde a los aminoácidos 64-224 de la proteína VP8\*core de 8 cepas de rotavirus (RRV, UK, YM, K8, MDR-13, B223, Wa, Ch-2) y una variante de la cepa RRV (nar3).

Inicialmente se evaluó la interacción de las proteínas GST-VP8\*core purificadas con eritrocitos humanos de tipo sanguíneo A, B y O. Se encontró que las proteínas de las cepas RRV, YM, Ch2-ibt y B223 hemaglutinaron. Al tratar los eritrocitos con neuraminidasa (NA) se determinó que las cepas RRV, Ch2-ibt y YM interaccionan con ácidos siálicos (AS) terminales, al verse disminuida la hemaglutinación, mientras la proteína de la cepa B223 interacciona con una molécula resistente a la neuraminidasa.

La unión de las proteínas recombinantes a células MA104 fue analizada mediante citometría de flujo y se demostró que las proteínas GST-VP8\*core de las cepas RRV, YM, Ch2-ibt, B223, nar3, K8 y MDR-13 son capaces de unirse a las células. A pesar de la unión con las células MA104, ninguna proteína fue capaz de disminuir la infectividad de las cepas probadas en forma total.

Con respecto a los glicanos que son reconocidos por las proteínas recombinantes se utilizó un microarreglo con más de 600 glicanos diferentes y se encontró que la cepa RRV reconoce al AS, la cepa YM y Ch2-ibt reconocen a un oligosacárido que contiene ácidos siálicos terminales, las cepas B223 y K8 reconocen al precursor H tipo II y las cepas UK y MDR-13 reconocen al mismo trisacárido llamado isoglobotriosa.

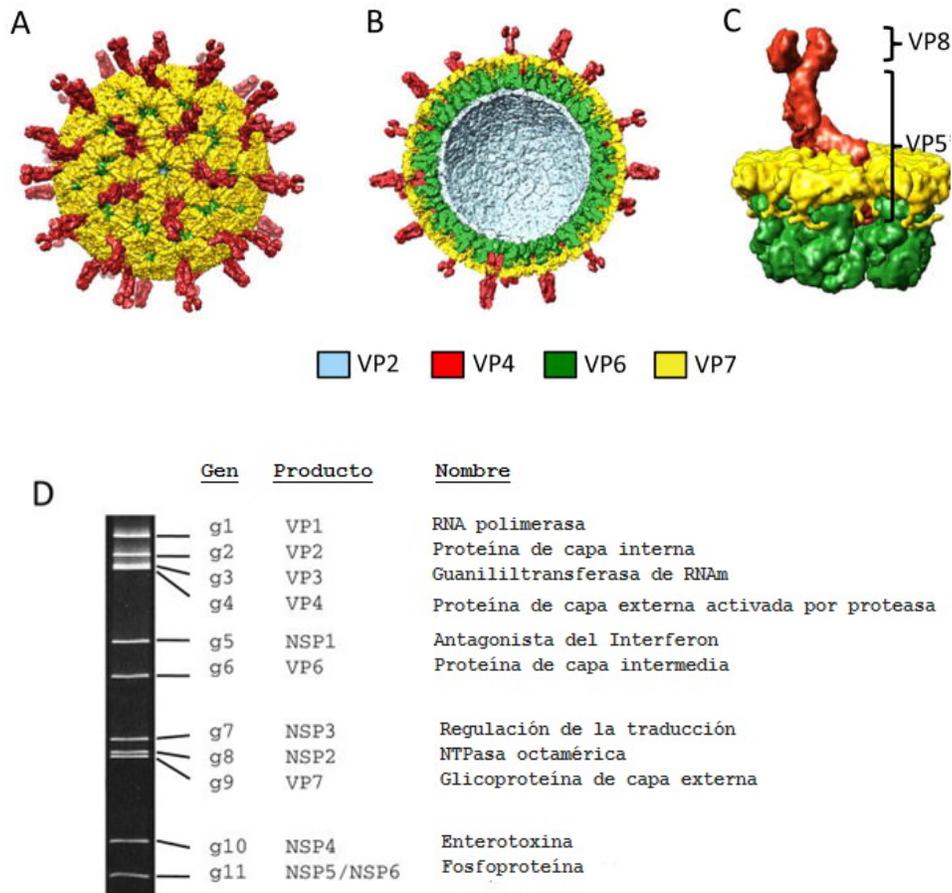
## 1. INTRODUCCION

### 1.1 Rotavirus: Generalidades y Estructura

Los Rotavirus son la causa principal de gastroenteritis aguda en infantes y niños jóvenes alrededor del mundo y son responsables de aproximadamente 600,000 muertes al año [Parashar, U.D, 2003]. En la ganadería también dan lugar a importantes pérdidas económicas debido a que causan diarrea en terneros, cerdos, aves de corral y ovejas entre otros. *In vivo* los rotavirus infectan los enterocitos maduros del intestino delgado.

Los rotavirus son virus no envueltos pertenecientes a la familia *Reoviridae* cuya partícula viral mide aproximadamente 100 nm, cuenta con un genoma de 11 segmentos de RNA de doble cadena (dsRNA), que codifica para 12 proteínas, 6 proteínas estructurales (VPs) y 6 proteínas no estructurales (NSPs). En la Tabla 1 se describen las principales características y funciones de estas proteínas.

El genoma de rotavirus se encuentra rodeado de una cápside icosaédrica de 3 capas concéntricas de proteínas formando partículas infecciosas (TLPs). La capa más interna está compuesta por 60 dímeros de la proteína VP2, la cual envuelve a los 11 segmentos de RNA de doble cadena del genoma viral y dos proteínas: VP1 (RNA polimerasa viral) y VP3 (guanililtransferasa) formando el núcleo del virus. La capa intermedia está compuesta por 260 trímeros de la proteína VP6. Las partículas que contienen estas dos capas proteicas se les conocen como partículas de doble capa (DLPs), no infecciosas pero transcripcionalmente activas. La capa externa está formada por 780 copias de la glicoproteína VP7 organizada en trímeros y de 60 proyecciones en forma de trímeros de la proteína VP4, las cuales están involucradas en las interacciones tempranas del virus con su célula huésped [Knipe & Howley 2013] **(Figura 1)**.



**Figura 1. Estructura de la cápside de rotavirus y su genoma dsRNA. (A)** Virión con 3 capas concéntricas de proteínas, en donde sobresalen espículas de la proteína VP4 a partir de la cápside externa compuesta por VP7 **(B)** Corte del virión revelando las 3 capas de proteínas: VP2, VP6 y VP7. **(C)** Productos del corte proteolítico de la proteína VP4, dando lugar a la proteína VP5\* y VP8\* **(D)** Segmentos de RNA de doble cadena observado mediante una electroforesis en gel con sus productos proteicos y sus funciones asociadas [Modificado Patton, 2012].

**Tabla 1. Principales funciones de las proteínas estructurales y no estructurales de rotavirus**

<b>Estructurales</b>		<b>No estructurales</b>	
<b>Proteína</b>	<b>Funciones</b>	<b>Proteína</b>	<b>Funciones</b>
<b>VP1</b>	RNA polimerasa dependiente de RNA, se une al extremo 3' del RNAm viral, forma complejo con VP3, interactúa con NSP5.	<b>NSP1</b>	Se une al extremo 5' del RNAm viral, proteína implicada en la inhibición de la respuesta a interferón.
<b>VP2</b>	Cubre al genoma viral, tiene la capacidad de unirse a ssRNA de manera inespecífica, es requerida para la actividad de replicasa de VP1.	<b>NSP2</b>	NTPasa con actividad helicasa, se une a ssRNA de manera inespecífica, forma parte de los viroplasmos en unión con VP1 y NSP5.
<b>VP3</b>	Guanilil-transferasa y metil-transferasa, se une a ssRNA de manera inespecífica, forma complejo con VP1.	<b>NSP3</b>	Se une al extremo 3' del RNAm viral e interactúa con la proteína eIF4GI, inhibe síntesis de proteínas celulares.
<b>VP4</b>	Conforma las espículas virales, es procesada proteolíticamente para formar la proteína VP5* y VP8*, participa en la unión y entrada a la célula, tiene actividad de hemaglutinina.	<b>NSP4</b>	Enterotoxina, moviliza el calcio intracelular. Está involucrada en la morfogénesis del virus, funciona como receptor para DLPs en RE.
<b>VP6</b>	Conforma la capa intermedia, proporciona estabilidad y homogeneidad a la morfología de las partículas virales.	<b>NSP5</b>	Fosfoproteína que forma viroplasmos junto con NSP2 e interactúa con VP2 y NSP6, se une a ssRNA de manera inespecífica, tiene actividad de cinasa.
<b>VP7</b>	Glicoproteína de unión a calcio, conforma la capa externa y participa en la entrada a la célula.	<b>NSP6</b>	Fosfoproteína que interactúa con la proteína NSP5 y está presente en viroplasmos.

## 1.2 Clasificación

A partir de sus características serológicas los rotavirus se clasifican en serogrupos, subgrupos y serotipos. Los serogrupos se definen con base a los epítopes presentes en la proteína VP6, existen 8 diferentes serogrupos (de la A a la H, designados RVA, RVB, RVC, etc.). Los grupos RVA, RVB y RVC han sido aislados tanto en humanos como en animales, mientras que los grupos D, E, F, G y H se encontraron solo en animales [Estes y Greenberg, 2013; Otonel, 2014].

La mayoría de las infecciones causadas por rotavirus en mamíferos y aves son causadas por rotavirus del grupo A. Dentro de este grupo con base en ensayos de neutralización de la proteína VP7 se han definido 27 serotipos (serotipo G) y con base en la proteína VP4 se han descrito 14 serotipos (serotipo P), estos se denotan con un número después de la letra G y P respectivamente [Estes & Greenberg, 2013]. Los rotavirus también se pueden clasificar en base a la secuencia nucleotídica del gen que codifica para la proteína VP7 y VP4 y se han caracterizado hasta la fecha 27 genotipos para VP7 (genotipo G) y 35 genotipos para VP4 (genotipo P) representándose con un número entre corchetes después del serotipo [Matthijnssens, 2011].

## 1.3 Proteínas de la capa externa de rotavirus

La proteína VP7 junto con la proteína VP4 son las 2 proteínas de capa externa, las cuales son blancos de reconocimiento del sistema inmune y los anticuerpos neutralizantes están dirigidos hacia ellas. Se unen a los receptores en la superficie de la célula huésped y participan en la entrada a la célula.

### 1.3.1 Proteína VP7

La proteína VP7 es una glicoproteína de 37 KDa que forma trímeros e interactúa por su cara interna con VP6. Su ensamblaje es dependiente de calcio, una molécula de VP7 une dos iones de  $Ca^{2++}$  [Aoki, 2009].

La proteína VP7 interacciona directamente con distintas moléculas en la superficie de la célula huésped en un paso subsecuente al anclaje inicial del virus que ocurre a través de VP4. Contiene varios motivos de secuencias de unión a integrinas; el motivo CNP reconoce a la integrina  $\alpha\beta3$ , el motivo LDV a la integrina  $\alpha4\beta1$  y el dominio GPR a

la integrina  $\alpha\beta 2$  [Coulson, 1997]. La proteína presenta 3 dominios altamente inmunogénicos llamados A, B y C, los cuales han sido mapeados y localizados en las posiciones del aa 86 al 101, 142 al 152 y 208 al 221, respectivamente [Kapikian, 2001]. Los motivos presentes en esta proteína pueden ser observados gráficamente en la **Figura 2A**.

### 1.3.2 Proteína VP4

La proteína VP4 es clave en las interacciones tempranas del virus con su célula huésped. Tiene un peso molecular de 88 KDa y es procesada proteolíticamente por tripsina originando dos proteínas: VP5\* (60KDa) localizada hacia el extremo carboxilo terminal de VP4 y VP8\* (28KDa) localizada hacia el extremo amino terminal de VP4 [López y Arias, 1981].

La proteína VP5\* contiene 2 dominios que interactúan con las células eucariontes. Uno de ellos es la región hidrófoba entre los aa 385 y 404 y el segundo es el dominio comprendido entre los aa 265 y 279 que se asocia periféricamente con la membrana [Denisova, 1999; Golantsova, 2004].

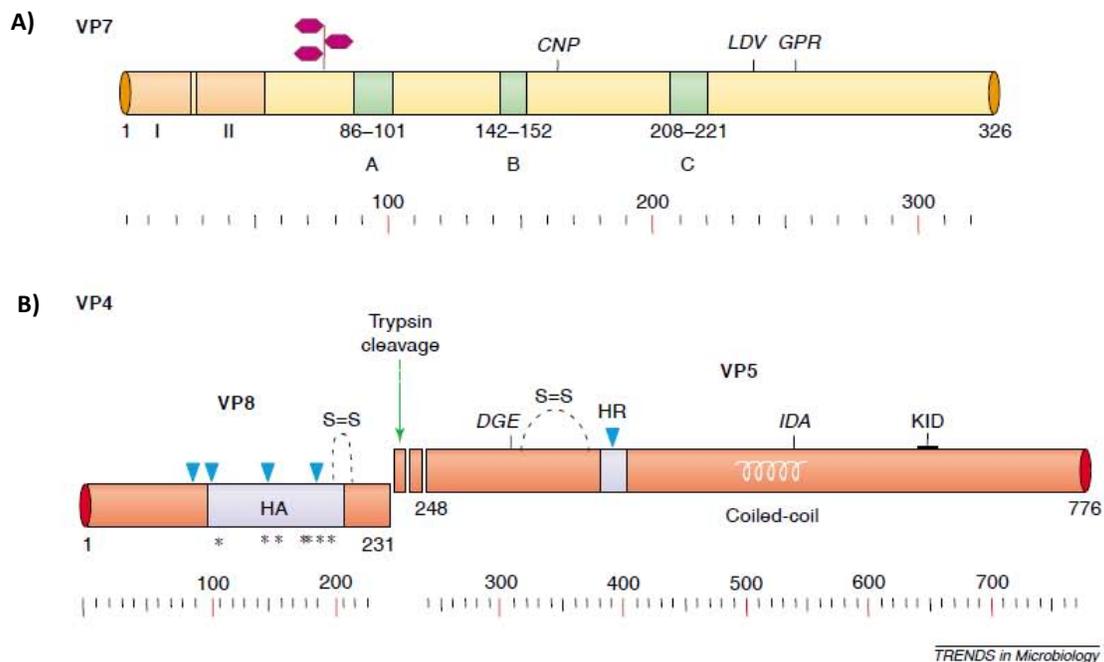
Dentro de la proteína VP5\* de la cepa de rotavirus RRV, existe un puente disulfuro entre los aminoácidos C318 y C380 [Cuadras, 1998]. También se han descrito dos sitios de unión a integrinas, la secuencia tripéptido IDA la cual puede interactuar con la integrina  $\alpha 4\beta 1$  y el tripéptido DGE el cual es capaz de interactuar con la integrina  $\alpha 2\beta 1$  [Coulson et al. 1997 y Zárata et al. 2000]. Además de la secuencia tripéptido KID que interactúa con la proteína constitutiva de estrés calórico Hsc70 [Zarate et al., 2003] (**Figura 2B**).

La proteína VP8\* está compuesta de 231 aminoácidos, un análisis bioquímico de la proteína recombinante VP4 de la cepa RRV demostró que la proteína VP8\* contiene un core resistente a proteasa a partir de los residuos A46 al R231 [Dormitzer, 2001]. El core contiene 2 cisteínas (C203 y C216), las cuales forman un puente disulfuro, una región hipervariable (T72 - C203) y una región de hemaglutinación (HA) presente del aa 93 al 208 [Fuentes-Panana et al, 1995]. Estas regiones pueden observarse en la Figura 2B.

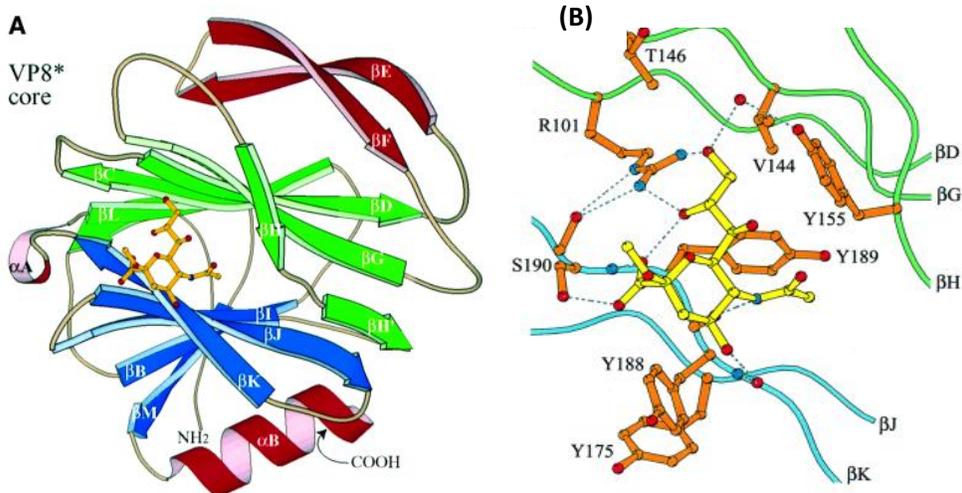
La proteína VP8\*core de la cepa RRV que incorpora los residuos E62 – L224 se cristalizó en presencia de ácidos siálicos (AS) y mediante Resonancia Magnética Nuclear

(RMN) se determinó la estructura de la proteína VP8\*core que incorpora los residuos L65-L224 en ausencia de su ligando. Se observó que las proteínas VP8\*core obtenidas son monoméricas y se pliegan en 12 hebras antiparalelas en forma de  $\beta$ -sándwich, un pliegue parecido al dominio de unión a carbohidratos que se encuentra en la familia de las galectinas y lectinas. Así mismo, se describió el sitio de unión al ácido siálico (AS) como un surco profundo en donde las cadenas laterales de los aa Y188 y S190 forman el borde del surco, el anillo aromático del aa Y155 forma el borde opuesto y las cadenas laterales de los aa R101, V144, K187 y Y189 forman la base [Dormitzer, 2002] (**Figura 3**).

Posteriormente se reportaron las estructuras cristalográficas de las proteínas VP8\*core de dos cepas humanas NA-resistentes (Wa y DS1) y una cepa animal NA-sensible (CRW-8) [Monier 2006; Yu 2011].



**Figura 2. Esquema de las proteínas VP4 y VP7. (A)** La proteína VP7 contiene 3 sitios antigénicos que se muestran como A, B y C. Existen también 3 sitios de reconocimiento de integrinas: CNP ( $\alpha\beta 3$ ), LDV ( $\alpha 4\beta 1$ ) y GPR ( $\alpha\beta 2$ ). **(B)** La proteína VP4 compuesta de 776 aminoácidos al ser cortada proteolíticamente con tripsina origina dos proteínas: VP5\*, la cual muestra dos sitios de unión a integrinas DGE ( $\alpha 2\beta 1$ ) y IDA ( $\alpha 4\beta 1$ ) y un sitio de unión a Hsc70 (KID). La proteína VP8\* (231 aminoácidos) presenta un sitio de hemaglutinación [López & Arias, 2004].



**Figura 3. Estructura cristalográfica de la proteína VP8\*core de la cepa RRV de rotavirus. (A)** Diagrama que muestra los dos dominios tipo lectina de la proteína VP8\* (Hojas  $\beta$  en verde y azul) en unión al AS (bolitas y palitos). **(B)** Diagrama que muestra los detalles de unión de la proteína VP8\* core con el AS. Las líneas punteadas muestran los puentes de hidrógeno y las moléculas en naranja muestran los principales residuos de VP8\* que interactúan con la molécula de AS [Tomado de Dormitzer, 2002].

#### 1.4 Unión y entrada

Las infecciones virales inician con la unión del virus a su célula hospedera seguido por la internalización al citoplasma, donde se lleva a cabo la replicación del genoma y la expresión de sus proteínas.

Se ha observado que la infectividad de diversas cepas de rotavirus de origen animal disminuye al tratar a las células con neuraminidasa (NA), enzima que corta AS terminales en glicoconjugados, demostrando que los AS son importantes en la entrada de algunas cepas de rotavirus [Ciarlet et al., 2002]. Por lo anterior se ha clasificado a los rotavirus en cepas NA-sensibles (baja infectividad con el tratamiento) y NA-resistentes (no hay disminución de la infectividad). La resistencia al tratamiento con la NA no significa que estos últimos no necesitan al AS para la adhesión, ya que se sabe que existen oligosacáridos que contienen AS sub-terminales de poca accesibilidad a ser cortados por la NA [Hoshino, 1987]. Realizando mutagénesis sitio dirigida de aminoácidos seleccionados en la cepa RRV, se demostró que los aminoácidos Y155 y el tripéptido YYS localizado en las posiciones 188-190 son esenciales para la unión al AS [Isa, 1997].

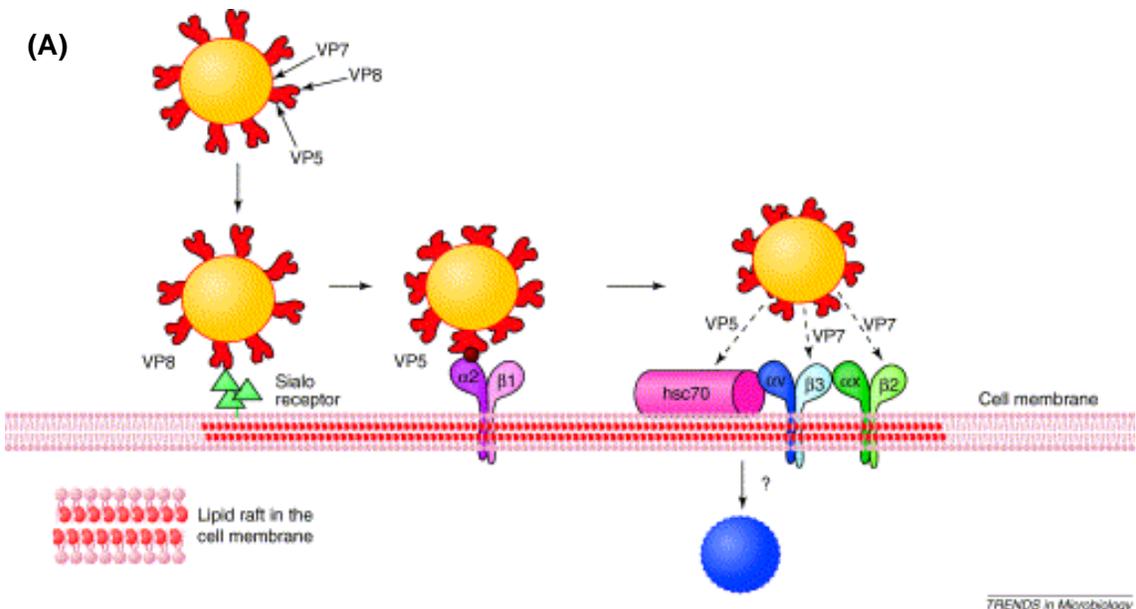
Además de los AS se han caracterizado otras moléculas de superficie que interactúan con rotavirus entre las que se encuentran las integrinas  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha x\beta 2$ ,  $\alpha v\beta 3$ , la

proteína de choque térmico Hsc70 y algunos gangliósidos. Debido a estas interacciones López y Arias en 2004 propusieron un modelo de entrada de la cepa mejor caracterizada RRV (NA-sensible) a la célula huésped, la cual se sugiere interacciona en primera instancia con residuos de AS presentes en la membrana a través de la proteína VP8\* mediante los residuos de arginina 101, serina 190 y tirosina 188 [Isla, P; et al. 1997; Dormitzer, 2002].

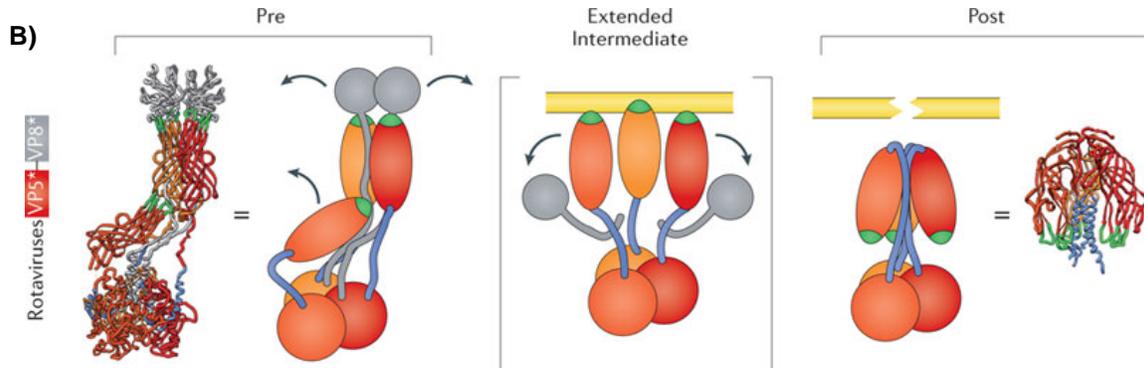
Esta interacción inicial se cree induce un cambio conformacional de VP4 que conduce a la interacción del dominio DGE presente en VP5\* con el dominio I de la integrina  $\alpha 2\beta 1$  [Zarate, 2000; Graham, 2003]. Posteriormente el virus interacciona con otras tres moléculas: la proteína Hsc70 a través del dominio KID de VP5\* [Zarate, S. *et al.*, 2003], con la integrina  $\alpha \nu\beta 3$  mediante el dominio CNP de VP7 y con la integrina  $\alpha \nu\beta 2$  a través de GRP de VP7 [Graham *et al.*, 2003] **(Figura 4A)**.

Se desconoce cuál es el orden en el que se llevan a cabo estas últimas interacciones o si todas son necesarias para que el virus infecte. Sin embargo, recientemente en el 2012 Trask S.D propuso un modelo que muestra los cambios conformacionales que le pueden ocurrir a la proteína VP4 para penetrar a la célula una vez unida a ella **(Figura 4B)**. Este modelo plantea que se requieren cambios conformacionales en las espículas de la proteína VP4 para facilitar la eficiente penetración del virus a la célula. Tras observar que las partículas que son tratadas con tripsina entran más rápidamente a las células en comparación a las no tratadas, se cree que la ruptura ocasionada por la tripsina le da un orden estructural a la espícula induciendo una forma flexible entre la proteína VP8\* y la proteína VP5\*, en donde VP8\* se separa del cuerpo de VP5\* ligeramente, quedándose unida a esta a través de un segmento N-terminal.

Como antes se mencionó, la proteína VP5\* tiene una actividad lipofílica que es de gran importancia para entrar a la célula, sus asas hidrofóbicas le permiten la interacción del C-terminal con la membrana, logrando que los 3 dominios  $\beta$ -barril de VP5\* se puedan proyectar al exterior, lo que resulta en la postpenetración de la proteína VP5\*, para finalizar con la alteración de la membrana y la entrada del virus a la célula. Después del evento asociado a la entrada se propone que hay una disociación de la proteína VP7 debido a los bajos niveles de calcio en el endosoma [Trask, 2012] **(Figura 4B)**.



TRENDS in Microbiology

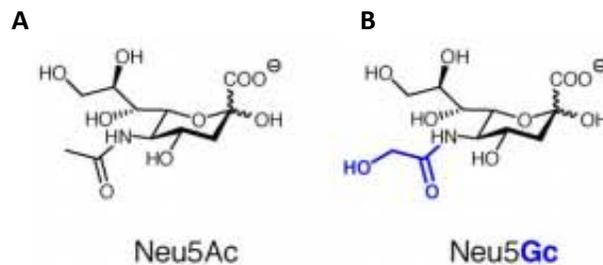


**Figura 4. Modelos de entrada de rotavirus a la célula (A)** Interacción de la cepa RRV con diferentes receptores encontrados en la membrana celular. Se muestran las proteínas estructurales de rotavirus y los diferentes receptores propuestos para dichas interacciones. La primera interacción del virus con la célula se lleva a cabo entre la proteína viral VP8\* y un receptor sialidado celular. Después, las proteínas VP5 y VP7 interaccionan con las integrinas  $\alpha\beta 1$ ,  $\alpha\beta 3$ ,  $\alpha\beta 2$  y con la proteína hsc70. (Modificado de López & Arias, 2004). **(B)** Modelo que muestra los cambios conformacionales que realiza la proteína VP4 (VP5\*- VP8\*) (ProteinData Bank IDs 3IYU y 1SLQ) durante su penetración a la membrana celular. Se observa que posterior a la unión del receptor celular, VP8\* (gris) se separa del cuerpo de VP5\* aunque sigue unido a este a través de un segmento N-terminal, los loops hidrofóbicos de VP5\* (verdes) interactúan con la membrana celular (amarillo). Los 3 dominios  $\beta$ -barril de VP5\* (naranjas) se pueden entonces proyectar al exterior, para finalizar con la disrupción de la membrana debida a este cambio conformacional [Modificado de Trask S.D, 2012].

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Ácidos siálicos como receptores de rotavirus.

El ácido N-acetil neuramínico (Neu5Ac) y el ácido N-glicolil neuramínico (Neu5Gc) son los ácidos siálicos más comunes en la naturaleza, que se expresan en la superficie de las células en la mayoría de aves y mamíferos. Los AS son usualmente localizados en la parte terminal de glicoconjugados, median y regulan un amplio rango de interacciones célula-célula y son utilizados como receptores durante la infección de una gran variedad de patógenos tales como el virus de la influenza y orthoreovirus [Kelm, 1997; Olofsson, 2005]. La diferencia entre el Neu5Gc y el Neu5Ac es que el primero contiene un grupo hidroxilo en el motivo N-acetil (**Figura 5**), además de que el Neu5Gc no es sintetizado en tejidos humanos debido a que existe una mutación en la hidroxilasa encargada de esta función.



**Figura 5. Ácidos siálicos más frecuentes en la naturaleza. (A)** Ácido N-acetil neuramínico **(B)** Ácido N-glicolil neuramínico.

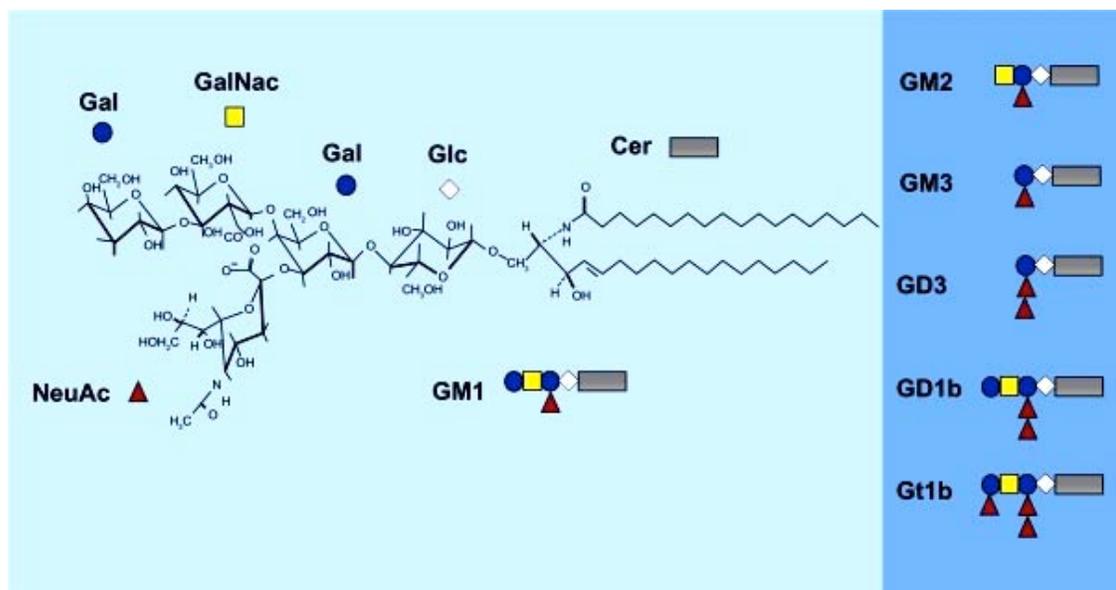
Existe una gran variedad de cepas de rotavirus con requerimientos distintos para unirse a la célula huésped e infectar. Las cepas que se han descrito como NA sensibles, es decir las que reconocen a los AS terminales localizados en las membranas de las células huésped, pertenecen a los genotipos: P[1], P[2], P[3] y P[7] [Ciarlet, 1999; 2002].

En nuestro laboratorio se logró aislar una variante de la cepa RRV, llamada nar3, la cual tiene mutaciones puntuales en el gen codificante para la proteína de capa externa VP4. La mutante nar3 no requiere de la interacción con AS para su entrada a las células, lo cual la hace resistente al tratamiento de las células con NA (NA resistente) en comparación con la cepa de origen RRV (NA sensible) [Mendez et al, 1993]. Las

mutaciones se localizan en la proteína VP4 en los siguientes aminoácidos: 37 (Leu a Pro), 187 (Lys a Arg) y 267 (Tyr a Cys). La proteína VP8\*core conserva únicamente la mutación en el aminoácido 187.

## 2.2 Gangliósidos como receptores de rotavirus

Los gangliósidos son importantes moléculas de la membrana celular y se encuentran dentro de una gran familia de lípidos anfipáticos que contienen uno o más residuos de AS. Están presentes en todas las membranas plasmáticas de células de mamíferos y aves. Los gangliósidos están compuestos de una cadena de oligosacáridos de longitud variable anclado a una ceramida [Proia R, 2003]. Los carbohidratos que pueden ser añadidos son: glucosa (Glc), galactosa (Gal), N-acetilgalactosamina (GalNAc), N-acetilglucosamina (GlcNAc) y el AS más común (Neu5Ac) (**Figura 6**). A pesar de que no se ha descrito bien su mecanismo, los gangliósidos juegan un importante papel en la adhesión, interacciones célula-célula y transducción de señales [Yu, 2011].



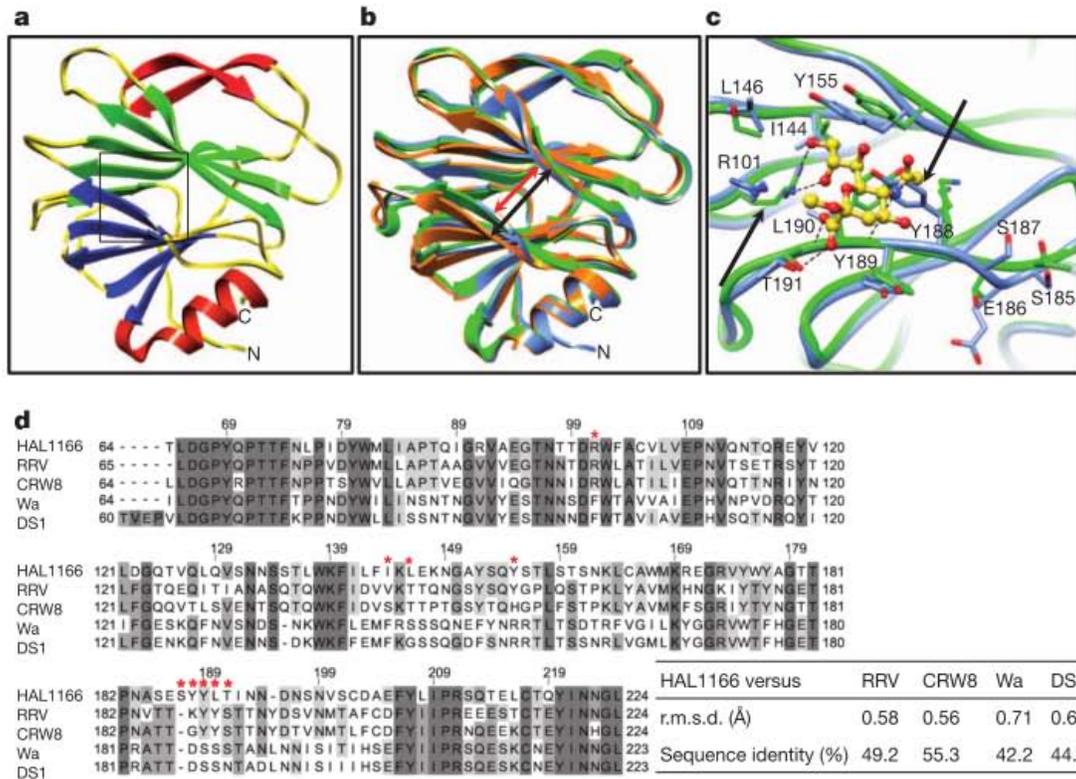
**Figura 6. Estructura general de los gangliósidos.** La estructura del gangliósido GM1 se muestra en detalle. La cadena de oligosacáridos está compuesta de glucosa (Glc), galactosa (Gal), N-acetilgalactosamina (GalNAc) y de ácido N-acetil neuramínico (NeuAc). La ceramida se compone de esfingosina con una cadena de ácido graso. En el recuadro azul se muestra la composición de algunos gangliósidos de manera gráfica [Tomado de Nieto, 2011].

La participación de los gangliósidos en la infección de rotavirus humanos fue sugerida al bloquear el gangliósido GM1a con la subunidad  $\beta$  de la toxina del cólera, molécula que se une específicamente a GM1a, y observar la disminución de la infectividad de dos cepas humanas de rotavirus KUN y MO (NA-resistentes) [Guo, 1999].

Posteriormente se describió que tanto las cepas NA-sensibles como NA-resistentes se unen a gangliósidos. Sin embargo, existen distintas especificidades de gangliósidos vinculantes. Mediante la cromatografía en capa fina se observó que las cepas NA-sensibles (SA11 y NCDV) se unen a gangliósidos con residuos de AS terminales, mientras que la cepa NA-resistente (UK) reconoce a gangliósidos con AS sub-terminal. Por otro lado se identificó a la secuencia terminal sialil-galactosa (NeuGc/NeuAca3-GalB) como la estructura mínima requerida para la unión de cepas NA-sensibles [Delorme, 2001].

Mediante el uso de espectroscopía, de resonancia magnética nuclear (NMR), modelamiento molecular y ensayos de infectividad, se describieron las interacciones entre la proteína VP8\* de la cepa de rotavirus humano Wa (NA-resistente) y la cepa porcina CRW-8 (NA-sensible) con los residuos glicosilados del aceramido-GM1 y el aceramido-GD1a. La proteína VP8\* de la cepa Wa (NA-resistente) se unió al AS presente en GM1 mientras que la proteína VP8\* de la cepa CRW-8 (NA-sensible) se unió al AS presente en GD1a y no viceversa [Haselhorst, 2009].

Se ha observado que la diferencia en la preferencia y afinidad de la proteína VP8\* de rotavirus hacia los residuos Neu5Gc y Neu5Ac depende principalmente de las características de los aminoácidos presentes en la posición 157 y 187, que se encuentran en el sitio de unión a AS, permitiendo que la abertura del surco sea estrecha o angosta [Yu, 2012]. Se comparó las estructuras cristalográficas de la cepa animal RRV y 2 cepas humanas Wa y HAL1166 previamente reportadas y se observó que los aminoácidos que se encuentran involucrados en la unión a glicanos juegan un papel importante en la abertura del surco. En la **Figura 7b** se observa que la cepa animal RRV tiene un surco más estrecho (Flecha roja) en comparación con el surco de la cepa humana Wa (Flecha negra), sugiriendo que esta es una de las razones de preferencia a los diversos glicanos [Hu, 2012].



**Figura 7. Estructura cristalográfica de VP8\* de la cepa humana HAL1166 P[14] en comparación con otras estructuras VP8\* (a)** Representación de la estructura VP8\* de la cepa HAL1166 P[14], se muestra las betas plegadas características (en azul y verde), en el recuadro se muestra el sitio de unión a AS. **(b)** Alineamiento estructural de la proteína VP8\* P[14] (azul) con la proteína VP8\* de una cepa NA+ RRV (verde) y la proteína VP8\* de una cepa humana NA- Wa (naranja). **(c)** se muestran los aminoácidos involucrados en el sitio de unión a AS de la cepa RRV. **(d)** Alineamiento de la secuencia P[14] con otras secuencias animales NA+ (RRV y CRW-8) y NA- (Wa y DS-1) los residuos que interactúan con el AS están marcadas con estrellas rojas. Las secuencias altamente conservadas se muestran en color negro (<80 %) y las moderadamente conservadas (> 60%) con gris. [Liya Hu, 2012].

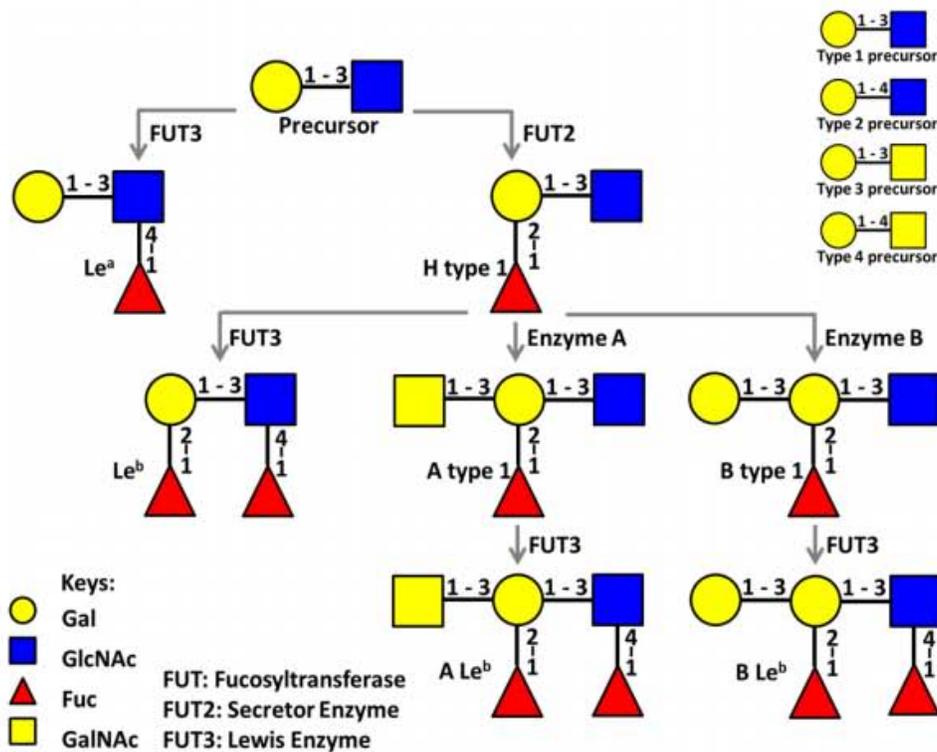
En nuestro grupo se analizó la importancia de los gangliósidos en células MA104 para la infección de dos cepas NA-sensibles (RRV, TFR-41) y dos cepas NA-resistentes (UK, Wa) mediante el silenciamiento de enzimas involucradas en la síntesis de gangliósidos; específicamente la enzima UDP-glucosa ceramida glucosil transferasa (UGCG) que realiza la adición de glucosa a ceramida y la enzima  $\beta$ -galactósido  $\alpha$ -2,3-sialil transferasa 5 (GM3-s) que realiza la adición de AS a lactoceramida para formar GM3, con el fin de bloquear la síntesis de gangliósidos de forma total y parcial respectivamente. Se observó una disminución de la infectividad de las 4 cepas.

Para evaluar si la disminución de la infección era debida a la incapacidad del virus para unirse a la célula, se realizaron ensayos de unión en cultivos tratados con siRNAs. Los resultados obtenidos mostraron que la disminución de gangliósidos no tiene efecto sobre la unión de ninguna de las 4 cepas de rotavirus utilizadas, sugiriendo que los rotavirus pueden unirse a AS que no pertenezcan a los gangliósidos [Martínez, 2012].

En un estudio más reciente se observó que cepas humanas (Wa, RV-3) y cepas animales (UK, TFR-41) disminuyeron su infectividad tras el bloqueo de GM1 con la toxina de cólera y anticuerpos anti GM1, además de observarse un aumento de la infectividad de las cepas humanas al suplementar GM1 en la membrana celular. Esto nos sugiere que estas cepas utilizan GM1 para entrar a la célula. Además mediante el uso de resonancia magnética nuclear (RMN) se mostró la unión de las proteínas recombinantes VP8\*core de las cepas humanas Wa y RV-3 (aa 64-223) a los residuos Neu5Ac y GalNac del gangliósido GM1a [Fiona, 2014].

### **2.3 Grupos antigénicos de Histocompatibilidad (HBGAs) como receptores de rotavirus**

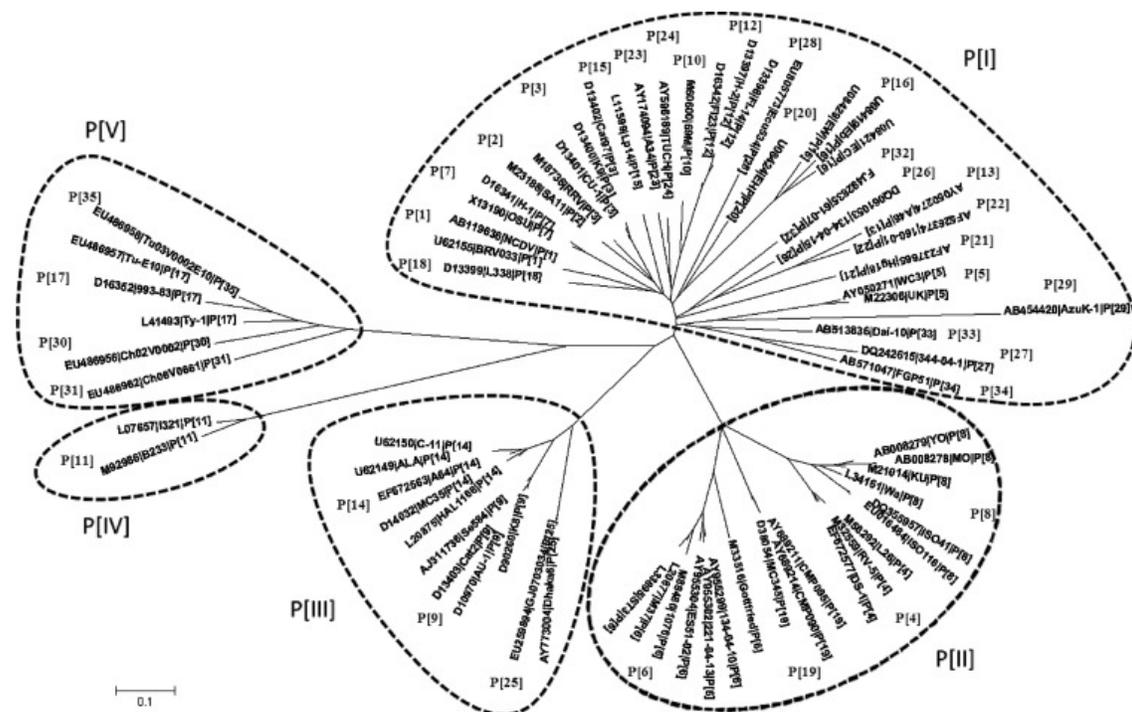
Los HBGAs son glicoconjugados que están presentes en los eritrocitos y en las células epiteliales de las mucosas. También pueden estar presentes como antígenos libres en fluidos biológicos tales como sangre, saliva, contenido intestinal y leche. Estos antígenos son sintetizados por adiciones secuenciales de monosacáridos a un precursor mediante la acción de glicosiltransferasas, enzimas reguladas principalmente por la familia ABO, Lewis y genes secretores [Huang, 2005] (**Figura 8**). Anteriormente se ha descrito que los HBGAs pueden ser utilizados por los norovirus [Marionneau, 2002].



**Figura 8. Vía de síntesis de los HBGAs, sistema ABO y Lewis.** Los HBGAs se sintetizan a partir de un precursor (tipo 1 – tipo 4). Las enzimas fucosiltransferasas, FUT 2 y FUT3, adicionan monosacáridos de fucosa a dichos precursores. Las enzimas A y B catalizan la adición de residuos N-acetil-galactosamina (GalNAc) y β -galactosa (β-Gal), respectivamente. Las reacciones catalizadas por las enzimas A, B y FUT2 dan como resultado el sistema ABO. Las reacciones catalizadas por FUT3 resultan en los antígenos de Lewis, si se realizan al precursor H tipo I se generan (Le<sup>a</sup>, Le<sup>b</sup>, ALe<sup>b</sup>, BLe<sup>b</sup>), mientras que si se realizan al precursor H tipo II se generan (Le<sup>x</sup>, Le<sup>y</sup>, ALe<sup>x</sup> y BLe<sup>y</sup>) [Hu, 2012].

El reconocimiento de HBGAs por la proteína VP8\* de rotavirus fue por primera vez sugerido en los estudios con la cepa humana HAL1166, perteneciente al genotipo P[14] [Hu, 2012]. Usando ensayos de unión con un panel de 511 glicanos, de los cuales más de 150 eran sializados, se demostró que la proteína VP8\*core (aa 64-224) de la cepa HAL1166 reconoce específicamente a los HBGAs de tipo A. Esta observación abrió la posibilidad de que la susceptibilidad a la infección por rotavirus este influenciada por la expresión genética de HBGAs en una población. La proteína GST-VP8\*core de la cepa HAL1166 no mostró una unión significativa con ningún glicano que contuviera AS terminal o subterminal, incluido en el panel de glicanos que se utilizó, sugiriendo que la unión con glicanos que contienen AS no es obligatoria para las cepas NA resistentes de rotavirus [Hu, 2012].

Un análisis filogenético comparó la proteína VP8\*core (aa 46-231) de 71 cepas diferentes y clasificó los 35 genotipos P de rotavirus en 5 genogrupos (P[I] a P[V]). Dependiendo de la localización de las cepas se observó que en los genogrupos P[I], P[IV] y P[V] se encuentran únicamente cepas que infectan animales, en el genogrupo P[II] se localizan únicamente cepas que infectan humanos y en el genogrupo P[III] cepas aisladas tanto de animales como de humanos (**Figura 9**) [Liu, 2012].



**Figura 9.** Árbol filogenético de la proteína VP8\* de rotavirus. Se seleccionaron 71 secuencias representativas de los 35 genotipos P de rotavirus y fueron agrupados en cinco genogrupos P (P [I] - P [V]) utilizando 50% de identidad de secuencia entre genogrupos [Yang Liu, 2012].

Con base en el análisis filogenético se caracterizó la unión de tres cepas humanas (T152 P[9], WAG8.1 P[14] y KTM368 P[25]), pertenecientes al genogrupo P[III] con HBGAs [Liu, 2012]. La unión fue determinada mediante ensayos de hemaglutinación y de unión a saliva y oligosacáridos sintéticos. Se observó que las proteínas VP8\*core de las tres cepas reconocieron al antígeno tipo A. En un estudio similar, las proteínas VP8\*core de las cepas humanas de rotavirus DS-1 [P4], RVP P[8], BM1596 P[6] y ST3 P[6]

pertenecientes al genogrupo P[II], reconocieron al antígeno H tipo I y al antígeno de Lewis b [Huang, 2012].

Recientemente se ha caracterizado la interacción de las proteínas recombinantes GST-VP8\*core (64-224) de las cepas neonatales humanas N155 P[11] y N1509 P[11], además de la cepa bovina B223 P[11], pertenecientes al genogrupo P[IV] con glicanos. Usando ensayos de unión con un panel de más de 600 glicanos y ensayos de infectividad, se identificó que las proteínas GST-VP8\*core de estas cepas interaccionan con el precursor H tipo II (LacNAc o Galb1-4 GlcNAc) [Ramani, 2013].

### **3. HIPÓTESIS**

La proteína VP8\*core de rotavirus es suficiente para llevar a cabo el reconocimiento a glicanos y las cepas NA-sensibles reconocen únicamente a glicanos que contienen AS terminales en su molécula, mientras que las cepas NA-resistentes no reconocen a glicanos que contienen AS terminales.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1 Objetivo General**

Identificar los glicanos que interaccionan con la proteína GST-VP8\*core de cepas de rotavirus NA-sensibles y NA-resistentes.

#### **4.2 Objetivos particulares**

- i. Clonar, expresar y purificar las proteínas recombinantes GST-VP8\* que corresponden a los aminoácidos 64-224 de las proteínas VP8\* (core de unión al AS) de 9 cepas de rotavirus.
- ii. Realizar ensayos de hemaglutinación con eritrocitos de distintos tipos sanguíneos (A, B y O)
- iii. Realizar ensayos de bloqueo de la infectividad con las proteínas recombinantes GST-VP8\*core
- iv. Observar unión de proteínas recombinantes a células MA104 mediante citometría de flujo
- v. Analizar la interacción de las proteínas GST-VP8\*core recombinantes con un panel de glicanos.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Cultivo celular y virus

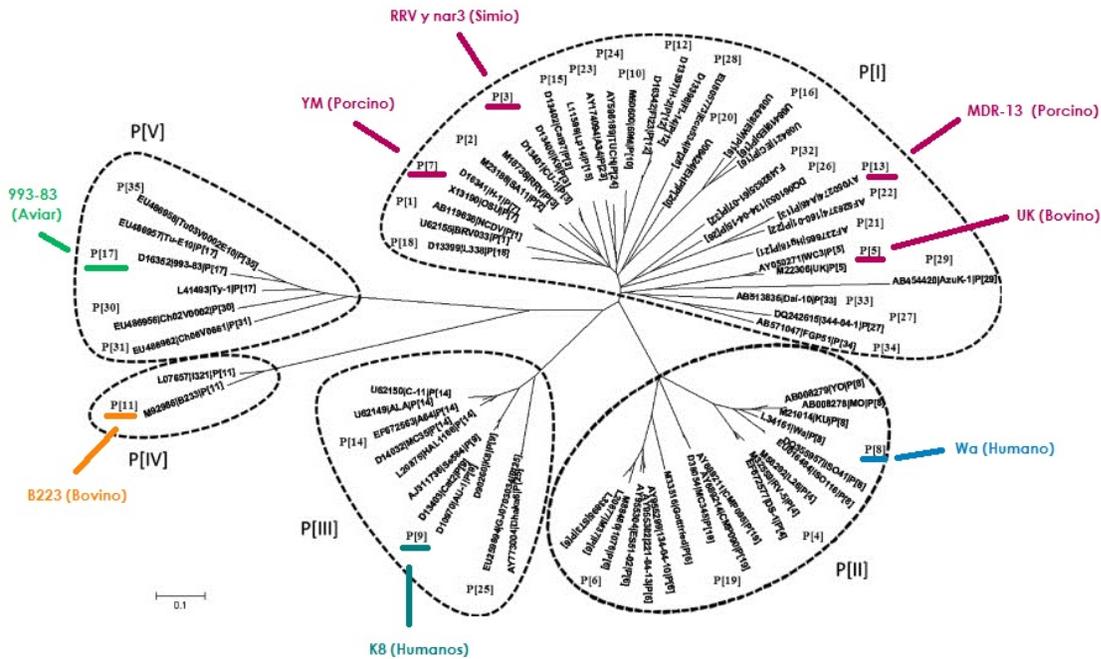
Las células MA014 de riñón de mono Rhesus fueron cultivadas en medio Advance DMEM suplementado con 3% de FBS (suero fetal bovino) y glutamina. Para la producción de los virus, las células fueron crecidas en frascos de plástico hasta la confluencia. Las células fueron infectadas por 1 hora a 37°C. El inóculo se retiró y los cultivos se incubaron por 16 horas a 37°C. Después de la infección la monocapa con el virus fue cosechada y se congeló y descongeló dos veces para romper la membrana de las células, todo el medio se recuperó, las partículas virales se estabilizaron con Ca<sup>2+</sup> 5mM y se activaron con tripsina [50 µg/ml] por 30 minutos a 37°C, los virus fueron almacenados a -70°C.

Las cepas virales usadas durante el proyecto se muestran en la Tabla 2. La selección es basada en el genogrupo, la especie de origen y el genotipo P al que pertenecen, utilizando las cepas más representativas de cada genogrupo (**Figura 10**).

**Tabla 2. Cepas virales utilizadas.**

Genogrupo [P]	Cepa	Genotipo [P]	Origen	Fuente <sup>f</sup>
I	UK	5	Bovino	D.R.Snodgrass <sup>a</sup>
	RRV	3	Simio	H. Greenberg <sup>b</sup>
	nar3	3	Simio	C. Arias <sup>c</sup>
	MDR-13	13	Porcino	I. Holmes <sup>d</sup>
	YM	7	Porcino	C. Arias <sup>c</sup>
II	Wa	8	Humano	G. Woode <sup>e</sup>
III	K8	9	Humano	H. Greenberg <sup>d</sup>
IV	B223	11	Bovino	P. Isa <sup>a</sup>
V	Ch-2	17	Aviar	H. Greenberg <sup>d</sup>

<sup>a</sup> Moredun Research Institute, Edinburgh, United Kingdom <sup>b</sup> Stanford University, Palo Alto, CA, USA; <sup>c</sup> Instituto de Biotecnología UNAM, Cuernavaca, Morelos, México; <sup>d</sup> University of Melbourne, Parkville, Australia; <sup>e</sup> College of Veterinary Medicine, Iowa State University, Ames, Iowa.



**Figura 10. Clasificación de las cepas de rotavirus utilizadas.** Basándose en la especie de origen, genotipo. Y los genogrupos descritos por Yang Liu, 2012.

El porcentaje de identidad de la proteína VP8\*core (aminoácidos 64-224) de las diferentes cepas utilizadas en este trabajo se encuentra en la **Tabla 3**. Podemos observar que la mayoría de las secuencias tienen alrededor del 50% de identidad en comparación con todas las analizadas, con excepción de nar3 que tiene una identidad de secuencia del 98.75% debido a que solo difiere en un aminoácido con RRV. La baja identidad de secuencia observada se debe a que la proteína VP8\*core comprende una región hipervariable en la proteína VP4.

**Tabla 3. Porcentaje de identidad de las secuencias de la proteína VP8\*core.**

Cepa	UK	K8	YM	MDR-13	RRV	Nar3	Aviar P[17]	Wa	B223
UK	100%								
K8	45.63%	100%							
YM	51.25%	54.38%	100%						
MDR-13	46.25%	43.75%	55%	100%					
RRV	56.88%	52.5%	73.13%	53.75%	100%				
Nar3	56.25%	53.13%	72.5%	53.13%	98.75%	100%			
Aviar P[17]	24.05%	32.91%	31.65%	27.85%	32.91%	33.54%	100%		
Wa	46.54%	38.99%	41.51%	42.77%	42.77%	42.14%	26.58%	100%	
B223	27.5%	28.75%	30.63%	27.33%	26.88%	28.13%	23.42%	25.16%	100%

## 5.2 Obtención de las proteínas GST-VP8\*core

### 5.2.1 Extracción del RNA viral

El RNA viral presente en células infectadas con las diferentes cepas de rotavirus utilizadas (Tabla 2) fue extraído utilizando TRIZOL (Invitrogen). Se tomaron 200 µl de virus y se le adicionó 800 µl de Trizol y se vortexeó durante unos segundos, posteriormente se agregó 200 µl de cloroformo a las muestras, se vortexeó y centrifugó a 13 000 r.p.m. durante 5 minutos. El sobrenadante se colocó en un nuevo tubo y se le agregó el mismo volumen de isopropanol, se vortexeó y los ácidos nucleicos se peletearon por centrifugación a 13 000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C. Después se retiró el sobrenadante y el pellet se lavó adicionando 500 µl de etanol al 100%, centrifugando a máxima velocidad durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se aspiró, el pellet se dejó secar y se resuspendió en 30 µl de agua libre de nucleasas.

### 5.2.2 Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR)

La región del gen que codifica para la proteína VP8\*core (aa 64-224) fue amplificada, utilizando RT-PCR y un set de oligonucleótidos complementarios a los nucleótidos del gen VP4 de interés (**Tabla 4**). Los oligonucleótidos utilizados contenían secuencias de reconocimiento de las endonucleasas (en rojo) *Bam*HI (oligonucleótido forward) y *Eco*RI (oligonucleótido reverse). Además el oligonucleótido reverse contiene dos codones de paro en fase inmediatamente después del aminoácido 224 para detener la traducción (en azul).

**Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para amplificar la secuencia VP8\*core del aminoácido 64 al 224 de las diferentes cepas de rotavirus.**

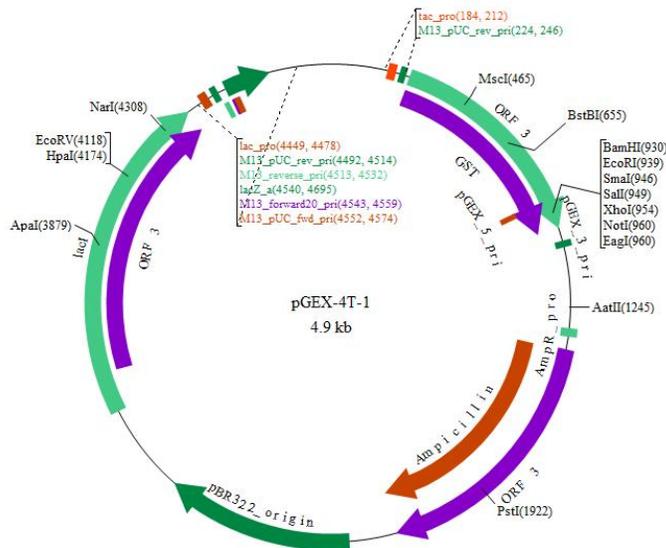
Cepas	Oligonucleótido Forward	Oligonucleótido Reverse
RRV y nar3	5' CGC <b>GGATCC</b> CTTGATGGTCCTTATCAAC 3'	5' CAG <b>AATTC</b> ATCATAACCCGTTATTAATGTA <b>CTC</b> 3'
YM		5' CAG <b>AATTC</b> ATCATAATCCATGATTGATATA <b>CTC</b> 3'
K8		5' CAG <b>AATTC</b> ATCATAAACCCATTGTTTATATAT <b>TG</b> 3'
UK	5' CGC <b>GGATCC</b> TTGGATGGACCGTATCAGC 3'	5' CAG <b>AATTC</b> ATCACAGCCCGTTGTTTATGTA <b>CTC</b> 3'
MDR-13	5' CGC <b>GGATCC</b> TTAGATGGGCCATACCAAC 3'	5' CAG <b>AATTC</b> ATCAAAGTCCATGATTAATATAAT <b>TTC</b> 3'
Ch-2	5' CGC <b>GGATCC</b> TTAGATGGACCTTATGCAC 3'	5' CAG <b>AATTC</b> ATCACAGACCATTTTAAAGAAA <b>ATC</b> 3'
Wa	5' CGC <b>GGATCC</b> TTAGATGGTCCTTATCAGC 3'	5' CAG <b>AATTC</b> ATCACAGACCATTATTAATATAT <b>TTCATTACA</b> 3'
B223	5' CGC <b>GGATCC</b> TTAGATGGGCCATATGCAC 3'	5' CAG <b>AATTC</b> ATCACAAATCCTCC <b>CTTATGTATTCTGTACA</b> 3'

Para amplificar la región de interés se utilizó el Kit SuperScript III One-Step Platinum® Taq HiFi (Invitrogen). Inicialmente se mezcló 1 µl de cada oligonucleótido (10 pmol) y 3 µl de RNA viral, la mezcla fue hervida durante 5 minutos, colocada en hielo y centrifugada. Después se le adicionó 20 µl de la mezcla que contiene 0.5 µl de enzima y 12.5 µl del buffer 2x Reaction Mix, obteniendo un volumen total de 25 µl. Esta mezcla se sometió a las siguientes condiciones de RT-PCR: 5 minutos a 30°C, 40 minutos a 50°C, 5 minutos a 95°C, posteriormente 40 ciclos de 40 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C y 45 segundos a 72°C, para finalizar con un ciclo de 5 minutos a 72°C y una temperatura final de 4°C. Los productos de PCR fueron confirmados mediante un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

### 5.2.3 Clonación

Para realizar la clonación se utilizó el vector de expresión pGEX-4T-1 (Pharmacia) (**Figura 11**). Este vector fue digerido con las endonucleasa BamHI y EcoRI. Posteriormente las enzimas fueron inactivadas durante 20 minutos a 80°C, y se incubó con 2 µl de la enzima Alkaline fosfatase (NE BioLabs), se dejó incubando durante 1 hora a 37°C. Por último se inactivó la enzima a 65°C durante 20 minutos. El plásmido y los productos de RT-PCR previamente obtenidos y procesados con las endonucleasas BamHI y EcoRI se purificaron siguiendo el protocolo QIAEX II Agarose Gel Extraction Protocol (Thermo Scientific).

Para la ligación se usaron 20 ng del producto de RT-PCR con 50 ng de plásmido en un volumen final de 10 µl, adicionando 400 U de la enzima DNA ligasa (NE Biolabs). La ligación de los productos de RT-PCR y el vector de clonación pGEX-4T-1 fue a 14°C toda la noche. El DNA se purificó mediante extracción con fenol-cloroformo y se transformó en células electrocompetentes *Escherichia coli* cepa JM109. Las bacterias transformadas se plaquearon sobre medio sólido LB (Luria-Bertani) que contenía carbamicina (100 µg/ml). Las colonias que contenían el inserto fueron seleccionadas utilizando PCR de colonia.



**Figura 11. Plásmido pGEX-4T-1.** Vector de expresión que contiene un gen de fusión glutatión S-transferasa (GST), siete sitios de restricción diferentes para endonucleasas. La expresión de la proteína está bajo control del promotor lac que se induce en presencia del análogo de la lactosa isopropyl  $\beta$ -D thiogalactosido (IPTG). Además incluye un gen interno lacI cuyo producto es una proteína represora que se une al operador del gen lac evitando la expresión del inserto hasta la adición de IPTG. Contiene un gen que codifica para un sitio de escisión por trombina, un origen de replicación y un gen de resistencia a ampicilina que permite la selección de bacterias transformadas.

#### 5.2.4 PCR de colonia

Para confirmar la presencia del inserto se realizó una PCR de colonia. La mezcla de PCR incluye: 1  $\mu$ l de 10x Thermo Pol Reaction Buffer, 0.4  $\mu$ l de dNTPs [5mM], 0.2  $\mu$ l de la enzima Taq Polimerasa, 0.2  $\mu$ l [10pmol] de cada uno de los oligonucleótidos (forward y reverse) y 8  $\mu$ l de agua, para obtener un volumen total de 10  $\mu$ l. A cada tubo se le adicionó una azada de la colonia seleccionada, y se trató con las siguientes condiciones de PCR: un ciclo de 5 minutos a 95°C, 30 ciclos de 40 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C y 45 segundos a 72°C, un ciclo de 5 minutos a 72°C para concluir a una temperatura de 4°C. La presencia del inserto fue confirmada con un gel de agarosa al 1%.

Las colonias que dieron positivo en la técnica de PCR de colonia, fueron crecidas en medio LB adicionado con ampicilina a una concentración de 100  $\mu$ g/ml por toda la noche y seguido con su purificación con el High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche). La presencia del inserto se verificó mediante la digestión con las enzimas BamHI y EcoRI. Finalmente la orientación del inserto y la secuencia exacta fue determinada mediante la secuenciación, realizada en la unidad de síntesis y secuenciación IBT, UNAM.

### **5.2.5 Expresión de la proteína recombinante GST-VP8\*core**

Para la expresión de la proteína recombinante GST-VP8\*core se utilizaron células *Escherichia coli* cepa BL21. En 50 ml de medio Luria adicionado con ampicilina (100 µg/ml) se realizó un inóculo con una dilución 1:10 de un cultivo previamente crecido toda la noche y se dejó crecer durante un periodo de 3 horas a 37°C para obtener una densidad óptica de 0.6 a una longitud de onda de 550. La producción de proteína se indujo con isopropyl-β-D-thiogalactopyranosido (IPTG) a una concentración final de 0.75 mM, durante 12 horas a 22°C. Las células fueron peleteadas centrifugando a una velocidad de 5000 r.p.m durante 10 minutos y fueron resuspendidas en 1 ml de PBS adicionado con un inhibidor de proteasas (floruro de metil sulfonilo) a una concentración final de 1 µM. Las bacterias se rompieron por sonicación con pulsos de 9.9 segundos y 3 segundos de descanso durante 10 minutos. Después las proteínas se solubilizaron con 0.5% de Tritón X-100 durante 15 minutos a temperatura ambiente (TA). La fracción insoluble se separó del sobrenadante mediante la centrifugación a 8300 r.p.m y el sobrenadante fue utilizado para la purificación de la proteína GST-VP8\*core.

### **5.2.6 Purificación de la proteína recombinante GST-VP8\*core**

Las proteínas recombinantes se purificaron a partir de 1 ml del sobrenadante utilizando 180 µl de glutatión-agarosa (Sigma) al 50%. La mezcla se dejó incubando a TA durante 1 hora en agitación constante. Para separar el sobrenadante se centrifugó durante 4 minutos a 2000 r.p.m, el pellet se lavó tres veces con 1 ml de PBS y se volvió a centrifugar durante 4 minutos a 2000 r.p.m. Posteriormente el pellet se resuspendió en 500 µl de glutatión reducido (10mM de glutatión reducido, disuelto en Buffer TN el cual contiene 150 mM de NaCl y 50 mM de Tris pH 8), se incubó durante 40 minutos a TA en agitación constante, se centrifugó y se recolectó el sobrenadante. Para eliminar el glutatión reducido las muestras fueron dializadas utilizando un casete de diálisis (Thermo Scientific), en 500 ml de buffer de intercambio (100 mM de NaCl y 10 mM de tris pH 7.4) durante dos horas con agitación constante. La segunda diálisis se realizó nuevamente en 500 ml de buffer de intercambio en agitación constante durante toda la noche. Las proteínas fueron recuperadas del casete, analizadas y cuantificadas como se describe más adelante.

### **5.2.7 Detección y cuantificación de proteínas recombinantes.**

La pureza de las proteínas expresadas y purificadas se analizó en un gel de acrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), visualizando con el colorante azul de coomassie.

Adicionalmente se realizó una identificación de las proteínas por Western Blot. Las proteínas se separaron en un gel SDS-PAGE al 10 % y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell). Las membranas fueron lavadas con PBS y bloqueadas durante 1 hora a TA con una solución de PBS que contenía leche en polvo al 5%. Después del bloqueo las membranas se incubaron 1 hora con el anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-GST (Sigma) diluido 1:5000. Los anticuerpos no unidos se eliminaron realizando 3 lavados con PBS-0.1% de leche y después se agregó el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa (0.2 mg/ml) diluido 1:5000 en 0.1% de leche. La incubación se llevó a cabo durante 1 hora a TA. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS-0.1% leche. La proteína específica se detectó por quimioluminiscencia.

La cuantificación de la concentración de proteínas se llevó a cabo mediante el método de Bradford., usando el lector de placas FLUOstar Omega (BMG Labtech). Se colocó 5µl de la proteína recombinante pura mas 100µl del reactivo de Bradford (diluido en agua 1:5). Se dejó incubar durante 5 minutos y se leyó a una longitud de onda de 280 nm. Con base a la curva de calibración realizada con albumina (BSA) en cada medición se calcularon las concentraciones de las proteínas recombinantes.

### **5.3 Comparación de las secuencias VP8\*core.**

Para determinar si las secuencias obtenidas en la unidad de síntesis y secuenciación correspondían a las reportadas anteriormente en la base de datos se realizó un alineamiento utilizando el programa Serial Cloner (versión 2.6.1). Las secuencias de la proteína VP4 de las cepas usadas son: B223 (GenBank: M92986.1), K8 (GenBank: D90260.1), Wa (GenBank: L34161), YM (GenBank: M63231.1), RRV (GenBank: M18736), UK (GenBank: M22306), MDR-13 (GenBank: L07886), Ch-2 (GenBank: EU486963), 998/83 (GenBank: AAA79026.1). Las secuencias de las proteínas VP8\*core se alinearon mediante el programa Clustal W PBIL.

#### **5.4 Ensayos de Hemaglutinación de la proteína recombinante GST-VP8\*core con eritrocitos de tipo sanguíneo A, B y O.**

Los eritrocitos de tipo sanguíneo A, B y O se recolectaron de voluntarios adultos. La sangre extraída fue mezclada 1:1 con la solución isotónica Alsevier (100 mM de Dextrosa, 30 mM de Citrato de Sodio, 3 mM de ácido cítrico, 70 mM de NaCl) y los eritrocitos fueron lavados dos veces con PBS. Se resuspendió 100  $\mu$ l de pellet en 10 ml de PBS para obtener una concentración final de 1% de eritrocitos. Se realizaron diluciones seriadas de proteína recombinante en volúmenes de 50  $\mu$ l de PBS, iniciando con una concentración de proteína recombinante de 200  $\mu$ g/ml. Posteriormente se adicionó 50  $\mu$ l de la suspensión de eritrocitos por pozo, la placa se agitó suavemente y se dejó incubar por una hora en hielo.

Para determinar el papel de los AS terminales en la interacción con las proteínas GST-VP8\*core, los eritrocitos se trataron con la neuraminidasa de *Arthrobacter ureafaciens* (Sigma-Aldrich). Esta enzima corta específicamente los ácidos siálicos terminales unidos con enlaces  $\alpha$  (2 $\rightarrow$ 3,6,8,9). Se utilizó una suspensión de eritrocitos al 10% en PBS, esta suspensión fue tratada con 25 mU de NA durante 2 h a 37°C. Posterior a la incubación los eritrocitos fueron lavados y el ensayo de hemaglutinación se llevo a cabo como se describió anteriormente.

#### **5.5 Ensayos de bloqueo de la infectividad con la proteína recombinante GST-VP8\*core**

Células MA104 crecidas en placas de 96 pozos fueron preincubadas con 50  $\mu$ l de proteína recombinante GST-VP8\*core (200  $\mu$ g/ml) durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente se infectaron las células con 200 unidades formadoras de focos (UFF) de virus, y se dejó incubar por una hora a 37°C. Después se retiró el inóculo viral, se lavó dos veces con Medio Mínimo Esencial (MEM) y se colocaron las células finalmente con MEM sin suero, y la infección se dejó proceder por 15 horas a 37 °C. Después de este tiempo las células fueron fijadas con acetona al 80% en PBS por 8 minutos; posteriormente las células infectadas se detectaron con un anticuerpo policlonal anti-TLP's de rotavirus, seguido con la incubación con la proteína A acoplada a peroxidasa (1:3000) y la visualización mediante el precipitado de carbazol. Los focos infecciosos en cada condición se determinaron por conteo manual utilizando un microscopio.

## 5.6 Ensayos de unión a células MA104 utilizando Citometría de Flujo

Células MA104 crecidas a 37°C en frascos para cultivo celular de 150 cm<sup>2</sup> fueron lavadas con PBS-0.54mM (PBS-EDTA). Se desprendieron usando PBS-EDTA y fueron resuspendidas en MEM sin suero. Una vez que las células estaban en suspensión se calculó el número de las células en un hematocitómetro y la viabilidad celular se corroboró usando azul de tripano.

Posteriormente en un tubo FACS se adicionó  $5 \times 10^5$  células, 2 ml de buffer de lavado (PBS, azida de sodio al 0.1% y Suero Fetal Bovino al 1%) y se centrifugó a 1000 r.p.m durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se colocó 50 µl de la proteína recombinante GST-VP8\*core a diferentes concentraciones (50, 200 y 600 µg/ml), además de GST como control negativo. Las células se dejaron incubar con las proteínas recombinantes durante 1 hora en hielo. Se retiró la proteína no unida lavando dos veces con 4 ml de Buffer de lavado y se fijaron las células con 50 µl de paraformaldehído al 2% durante 15 minutos. Transcurrido el tiempo se bloquearon las células con BSA al 1% durante 1 hora. La proteína recombinante se detectó usando el anticuerpo monoclonal anti GST (Sigma) a una dilución 1:2000 durante 1 hora. Se realizaron dos lavados con el buffer de lavado centrifugando a 1000 r.p.m durante 5 minutos. Se colocó el anticuerpo secundario anti ratón acoplado a Alexa 488 (Invitrogen) a una dilución 1:500 durante 1 hora. Se realizaron dos lavados y por último el pellet se resuspendió en 400 µl de PBS para su posterior análisis. Las muestras fueron analizadas en el citómetro de flujo (BD) y mediante el Software BD FACS Diva (FlowJo v9.3.3).

## 5.7 Screening de glicanos para las proteínas GST-VP8\*core

Para determinar la especificidad de unión entre las proteínas GST-VP8\*core y glicanos, las proteínas recombinantes purificadas se enviaron al Consortium for Functional Glycomics, Protein-Glycan Interaction Core-H, Emory University School of Medicine [<http://www.functionalglycomics>]], donde se analizó su interacción con un microarreglo que contenía más de 600 glicanos. Para el análisis se utilizó una concentración de 200 µg/ml de la proteína recombinante GST-VP8\*core y fue detectada usando un anticuerpo monoclonal anti GST (Sigma) marcado con un fluoróforo. La fuerza de unión al glicano fue expresada en términos de Unidades de Fluorescencia Relativa (RFU).

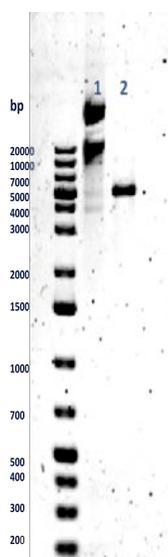
## 6. RESULTADOS

### 6.1 Obtención de proteínas recombinantes GST-VP8\*core de 9 cepas diferentes de rotavirus.

#### 6.1.1 Clonación de VP8\*core de diferentes cepas de rotavirus.

Para alcanzar el objetivo particular (i) “Clonar, expresar y purificar la proteína recombinante GST-VP8\* que corresponden a los aminoácidos 64-224 de la proteína VP8\* (core de unión al AS) de 9 cepas diferentes de rotavirus.”, se utilizó el vector de clonación pGEX-4T-1, mencionado en “Materiales y Métodos”.

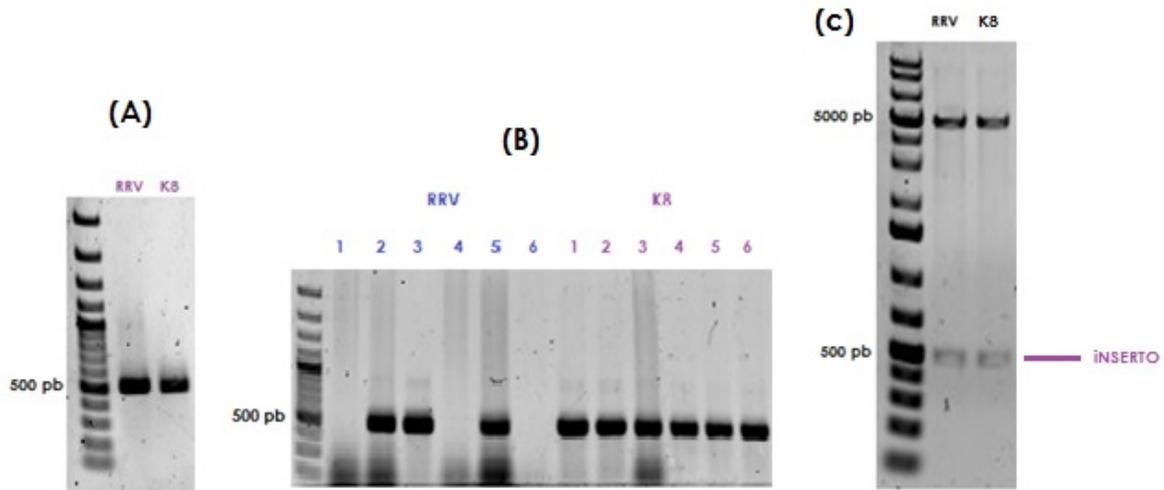
El plásmido pGEX-4T-1 fue purificado y digerido con las enzimas BamHI y EcoRI. Como se esperaba se observa una banda linealizada con un peso molecular de 4900 Kb (Figura 12).



**Figura 12. Plásmido pGEX-4T-1. (1)** pGEX-4T-1 sin digerir **(2)** pGEX-4T-1 digerido con enzimas de restricción: BamHI y EcoRI.

Los fragmentos correspondientes a la proteína VP8\*core de las cepas de rotavirus fueron amplificados mediante RT-PCR y observados en un gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de etidio (Figura 13A). Después de la digestión con las enzimas BamHI y EcoRI, el producto se purificó y se clonó en el plásmido pGEX-4T-1 previamente digerido con las mismas enzimas BamHI y EcoRI. Los insertos se confirmaron mediante PCR de colonia como se describe en “Materiales y Métodos” (Figura 13B). La presencia del inserto en las construcciones elegidas fue observada al realizar digestiones de las clonas

con las enzimas BamHI y EcoRI, observando el inserto con el peso molecular esperado (**Figura 13C**). En la Figura 13 se muestra la amplificación e identificación de fragmentos del gen de las cepas RRV y K8, como un ejemplo de metodología.



**Figura 13. Clonación de la proteína viral VP8\*core de las cepas RRV y K8. (A)** Bandas de los productos de RT-PCR con un peso aproximado de 480bp. **(B)** Identificación de colonias que contienen el inserto deseado mediante la técnica PCR de colonia. Se muestran las clonas positivas de cada una de las cepas analizadas con un inserto de 480bp. **(C)** Digestión de clonas positivas en donde se observa la presencia del inserto en el tamaño esperado.

### 6.1.2 Verificación de la secuencia de rotavirus clonada.

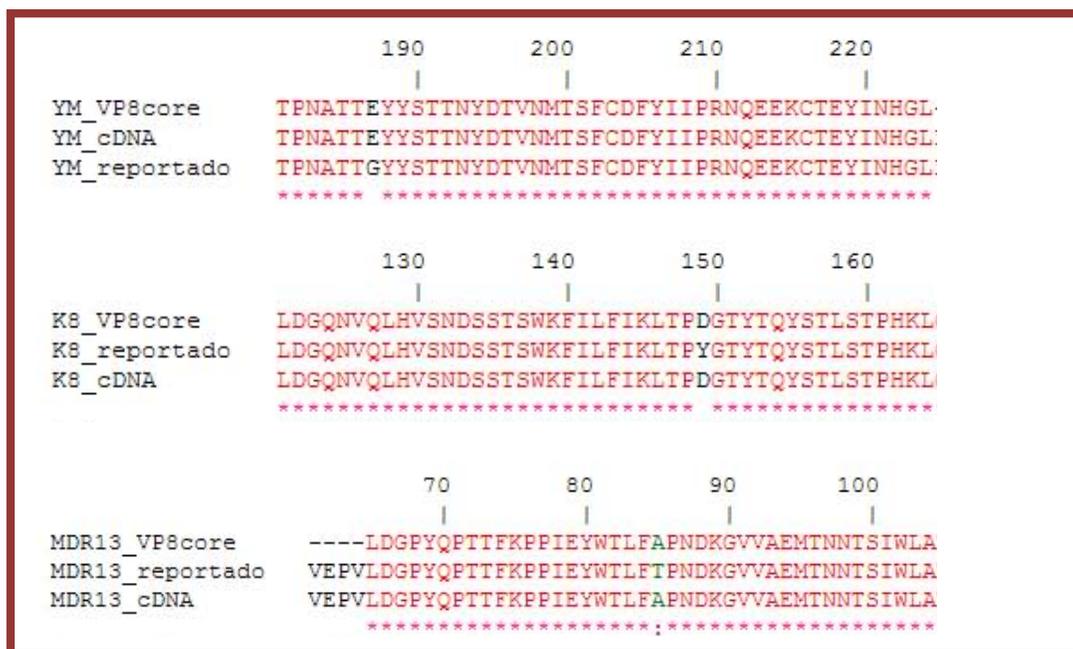
Para determinar la secuencia exacta de las clonas seleccionadas de cada cepa, se secuenciaron los insertos de las construcciones. Los resultados mostraron que las secuencias correspondiente al VP8\*core de las cepas RRV, B223, nar3, UK y Wa son idénticas a las reportadas anteriormente (**Tabla 4**). Se observó un cambio puntual en la secuencia de VP8\*core de cada una de las cepas K8, YM, y MDR-13, mientras que la cepa Ch-2 mostró varios cambios en comparación con la secuencia reportada previamente.

Para verificar el origen de los cambios observados en las cepas K8, YM, MDR-13 y Ch-2, se secuenció directamente los DNAs amplificados, obtenidos previo a la clonación y se comparó con la secuencia obtenida en nuestras construcciones. Se observó que los cambios obtenidos de las cepas K8, YM y MDR-13 son debido a que tenemos variantes de las cepas, ya que los cambios se observan en el producto de RT- PCR de manera general (**Figura 14**). Las diferencias en los aminoácidos de las cepas K8 y MDR-13 no

involucran a residuos que se encuentren en el sitio de unión a glicanos. Sin embargo el cambio observado en la cepa YM, resulta en el cambio del aminoácido 187, ácido glutámico en lugar de una glicina lo cual podría ser de relevancia ya que existe diferencia en las propiedades químicas de ambos aminoácidos, y el residuo 187 es el responsable de la diferencia en funcionalidad de las cepas RRV y nar3.

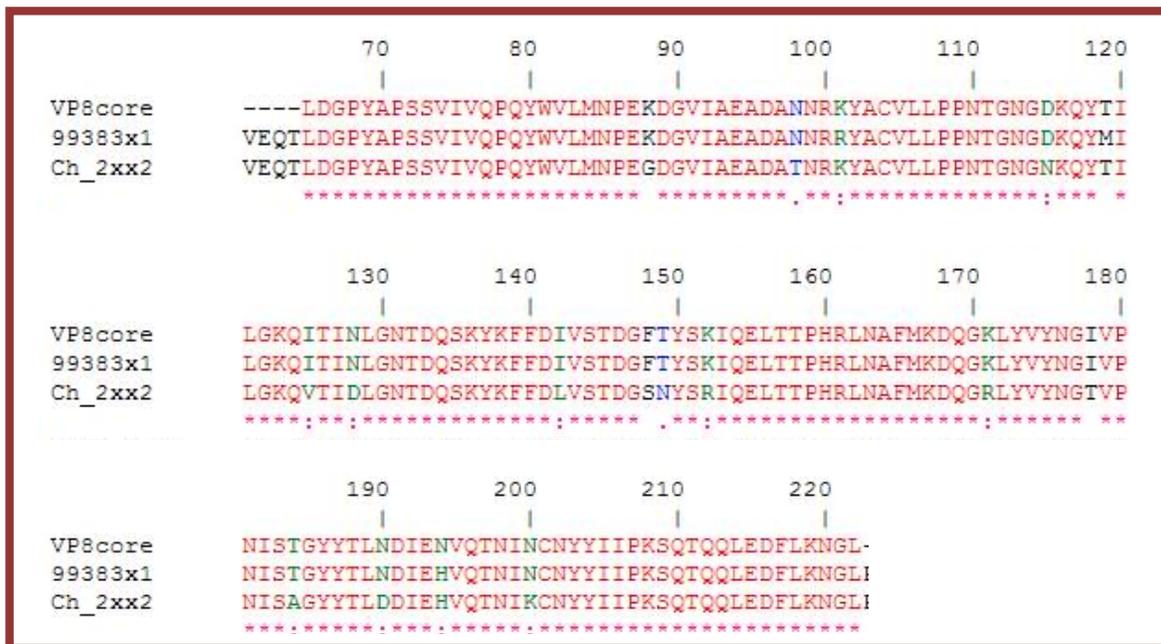
**Tabla 4. Comparación de secuencias.**

Cepa	Comparación
RRV	Secuencia idéntica
B223	Secuencia idéntica
Nar3	Secuencia idéntica
UK	Secuencia idéntica
Wa	Secuencia idéntica
K8	(D149 Y)
YM	(E187 G)
Ch-2	15 aminoácidos diferentes
MDR-13	(A85T)



**Figura 14. Comparación de la secuencia de aminoácidos de GST-VP8\*core, el cDNA y el reportado en GenBank de las cepas YM, K8 y MDR-13. En rojo se muestran los aminoácidos altamente conservados, en negro y verde los aminoácidos diferentes.**

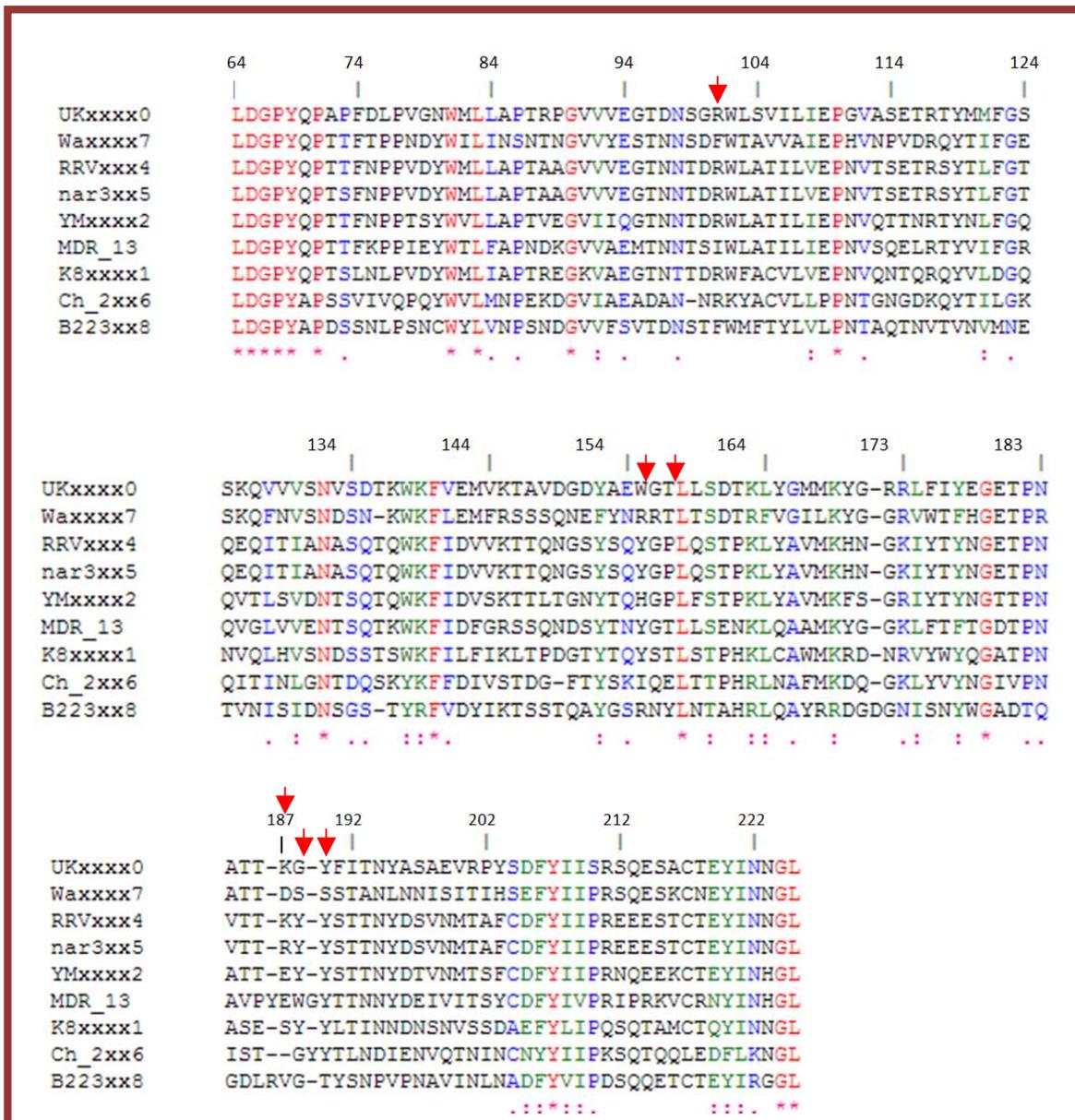
La cepa aviar Ch-2 mostró cambios en 15 aminoácidos al compararla con la secuencia reportada en GenBank. Al realizar un Blast de la proteína se encontró que la secuencia obtenida es más parecida a la cepa 993/83, cepa de origen aviar P[17] aislada de bovinos en 1992 en Alemania [Brüssow, 1992], teniendo una identidad de secuencia del 98%. La secuencia de la cepa 993/83 fue depositada por Rohwedder en 1995 en un estudio relacionado al análisis de secuencia de la proteína VP8\* de diferentes especies de aves, mientras que en nuestro laboratorio la muestra Ch-2 fue obtenida de la Universidad de Stanford, debido a que la posibilidad de que ocurriera un error en el envío es poca renombramos a este virus como Ch2-ibt P[17]. En la **Figura 15** se muestra el alineamiento de la secuencia obtenida de la proteína recombinante con las secuencias reportadas de Ch-2 (GenBank: EU486963) y 993/83 (GenBank: AAA79026.1).



**Figura 15. Alineación de secuencia VP8\*core aviar, la cepa 993/83 y la cepa Ch-2.** Se muestran en rojo y con una estrella los residuos conservados entre las tres secuencias, en negro, azul y verde las secuencias menos conservadas. La secuencia VP8\*core de la cepa aviar muestra un 98% de identidad de secuencia con la cepa 993/83.

Para observar los aminoácidos que están involucrados en el sitio de unión a glicanos (aa 101, 155, 157, 187, 188 y 189) y compararlos entre las cepas analizadas se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias VP8\*core obtenidas (**Figura 16**). Observamos que el R101 y el Y189 están presentes en la mayoría de las cepas, con variaciones presentes en la posición 101 en 4 cepas: B223 y Wa (fenilalanina), la cepa MDR-13 (isoleucina) y la cepa Ch2-ibt (licina), Existe variabilidad en el aminoácido 189 en las

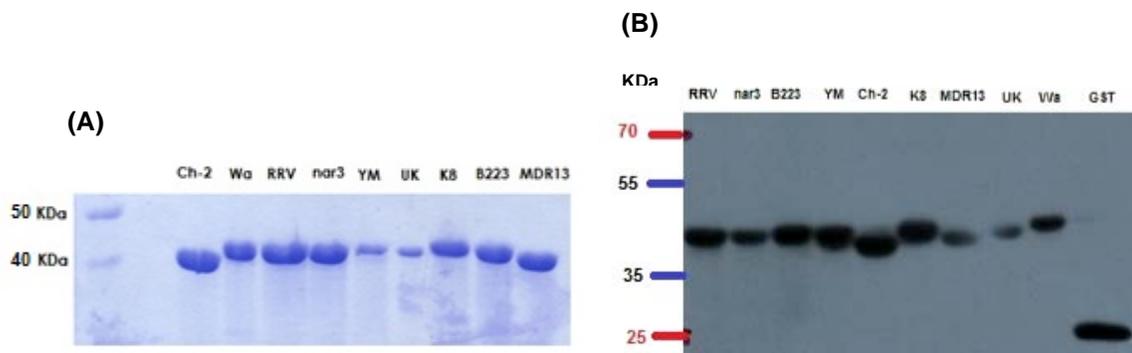
cepas Wa (serina) y B223 (threonina), mientras que en las otras posiciones se muestra una mayor variabilidad de aminoácidos. Por otro lado, en comparación con la cepa RRV, se observan varias deleciones e inserciones dentro del gen en las cepas B223, Ch2-ibt y la cepa MDR-13. Estas diferencias podrían modificar la apertura del sitio de unión a glicanos haciendo el pocket mas ancho o angosto, tal como se ha sugerido (Venkataram, 2014).



**Figura 16. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas VP8\* core de diferentes cepas de rotavirus.** Se observa con un asterisco las secuencias altamente conservadas (rojo) y con puntos las secuencias moderadamente conservadas (verde, y azul). Los residuos de interacción al AS importantes se marcan con flechas rojas (Alineamiento múltiple ClustalW).

### 6.1.3 Expresión y purificación de proteínas recombinantes.

Las proteínas GST-VP8\*core se han expresado y purificado como se ha descrito en “Materiales y Métodos”. Las proteínas fueron solubles y presentaron una sola banda. Las proteínas purificadas tenían por lo general una concentración entre 500-1000 µg/ml, pero la proteína GST-VP8\*core de las cepas YM y UK tuvieron repetidamente rendimientos más bajos. En la **Figura 17** se observan las proteínas purificadas de las distintas cepas separadas en un gel de SDS-PAGE teñido con azul de coomassie (Figura 17A) y mediante el ensayo de Western blot (Figura 17B).

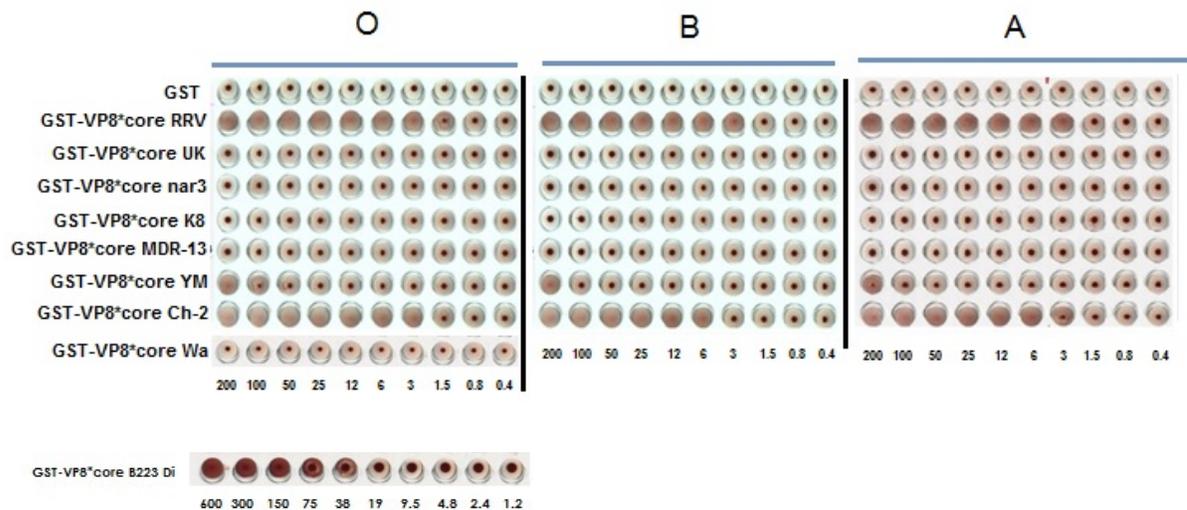


**Figura 17. Proteínas recombinantes GST-VP8\*core.** (A) SDS-PAGE y tinción con azul de coomassie (B) Ensayo de Western Blot para detectar GST-VP8\*core. Se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-GST (Sigma). Las proteínas recombinantes se muestran en un peso aproximado de 43 KDa.

### 6.2 Ensayos de Hemaglutinación con eritrocitos de tipo A, B y O.

La interacción de las proteínas GST-VP8\*core con ácidos siálicos fue analizada mediante hemaglutinación, ya que los eritrocitos son altamente sializados. En ensayos de hemaglutinación se utilizaron eritrocitos humanos de los tipos sanguíneos A, B y O, los cuales difieren entre sí por los residuos de monosacáridos que se expresan en la membrana de las células (Figura 8). Los resultados se muestran en la **Figura 18**.

Se observa que la proteína GST-VP8\*core de la cepa RRV hemaglutinó los eritrocitos de tipo A, B y O a partir de la concentración de 3 µg/ml. La proteína GST-VP8\*core de la cepa Ch2-ibt hemaglutinó los eritrocitos de los 3 tipos sanguíneos, con el tipo O hemaglutinó a partir de la concentración de 3 µg/ml y con el tipo A y B a partir de la concentración de 6µg/ml. La proteína GST-VP8\*core de la cepa YM hemaglutinó los eritrocitos de tipo A, B y O a partir de la concentración de 100 µg/ml. La proteína GST-VP8\*core de la cepa B223 hemaglutinó a partir de la concentración de 150 µg/ml. Las proteínas GST-VP8\*core de las cepas UK, MDR-13, K8 y Wa no hemaglutinaron ninguno de los tipos sanguíneos.



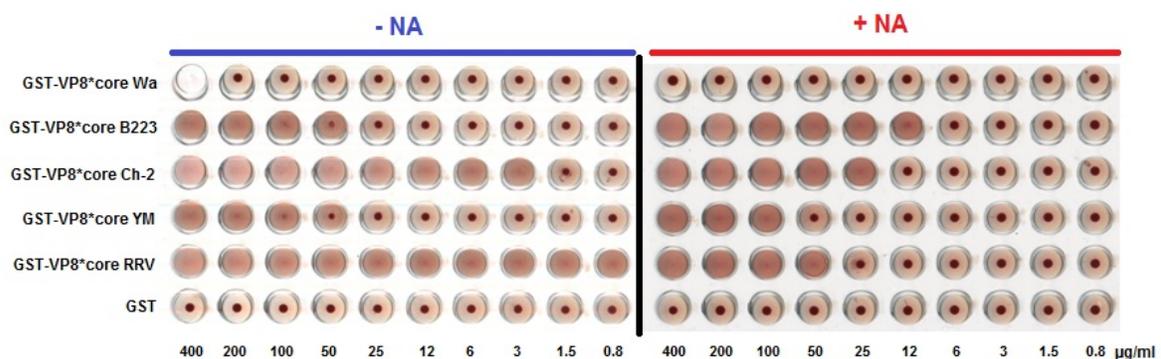
**Figura 18. Ensayos de hemaglutinación de eritrocitos humanos de tipo A, B y O con las proteínas recombinantes GST-VP8\*core.** Se realizaron diluciones seriadas de la proteína recombinante con PBS a partir de [200 µg/ml] y fueron colocadas en unión con eritrocitos de los 3 tipos sanguíneos durante 1 hora en hielo. La hemaglutinación se puede observar en los pozos en donde no se encuentra un pellet.

Los AS terminales presentes en la membrana de los eritrocitos pueden ser removidos utilizando NA. Para observar el efecto de la NA sobre la hemaglutinación de las proteínas GST-VP8\*core de las cepas RRV, YM, Ch2-ibt y B223 los eritrocitos se incubaron con 25 mU de neuraminidasa durante 2 h a 37°C y posteriormente se realizaron las pruebas de hemaglutinación como se describe en “Materiales y Métodos”. Los resultados se muestran en la **Figura 19**. Se utilizaron eritrocitos de tipo sanguíneo O, debido a que este tipo

sanguíneo no presenta antígeno A y B, facilitando la eliminación de los AS terminales en la membrana celular.

Los resultados mostraron que la hemaglutinación de los eritrocitos tipo O con las proteínas GST-VP8\*core de las cepas RRV, Ch2-ibt y B223 es sensible al tratamiento con 25mU de NA, ya que las proteínas GST-VP8\*core de la cepa RRV y Ch2-ibt disminuyen su hemaglutinación cuando los eritrocitos son tratados con NA, confirmando que la interacción con los eritrocitos es a través de los AS terminales. Por otro lado la proteína GST-VP8\*core de la cepa B223 aumenta su hemaglutinación cuando los eritrocitos son tratados con esta enzima, hemaglutinando a 12 µg/ml. Además podemos observar que la hemaglutinación de la proteína GST-VP8\*core de la cepa YM no es sensible al tratamiento con solo 25 mU de NA, sin embargo en otros experimentos con una mayor actividad de la enzima se ha demostrado la sensibilidad en la hemaglutinación de esta cepa (resultado no mostrado).

En el caso de las cepas RRV y Ch-2 la disminución de la hemaglutinación no fue total lo que sugiere que es necesario una concentración mayor de enzima o un tiempo de incubación más prolongado para eliminar completamente los residuos de AS presentes en la membrana. La proteína GST-VP8\*core de la cepa Wa y GST fueron utilizados como control negativo del experimento al no mostrar hemaglutinación.



**Figura 19. Efecto de la NA sobre la hemaglutinación.** Se realizaron diluciones seriadas de la proteína GST-VP8\*core de las cepas Wa, B223, Ch-2, YM y RRV a partir de [400µg/ml] y fueron colocadas en unión con eritrocitos sanguíneos de tipo O con y sin tratamiento con NA. Se observa una disminución de la hemaglutinación de las proteínas recombinantes de las cepas Ch-2 y RRV y un aumento en la hemaglutinación de la proteína recombinante de la cepa B223 cuando son unidas a eritrocitos tratados con NA.

Las observaciones realizadas con el ensayo de hemaglutinación sugieren que las proteínas GST-VP8\*core de las cepas RRV, YM, B223 y Ch2-ibt se expresaron de manera correcta, funcional y tienen la capacidad de unirse con su ligando.

En la Tabla 5 se muestra un resumen de los resultados obtenidos con los ensayos de hemaglutinación de la proteína GST-VP8\*core, además de los residuos importantes involucrados en el sitio de unión a glicanos de las diferentes cepas. No se observa una correlación en las características de los aminoácidos pertenecientes a las proteínas que hemaglutinaron y reconocen al AS, sin embargo observamos que 4 de las 5 proteínas de las cepas que no hemaglutinaron tienen en la posición 157 a la treonina y la mayoría de las cepas, que se han reportado en la literatura, sensibles a la NA contienen en la posición 157 una prolina y en el residuo 187 una glicina [Yu, 2013]. Esto podría resultar en una apertura angosta o estrecha en el sitio de unión, sin embargo aún no se tiene muy claro que aminoácidos regulan el tamaño de este pocket de unión.

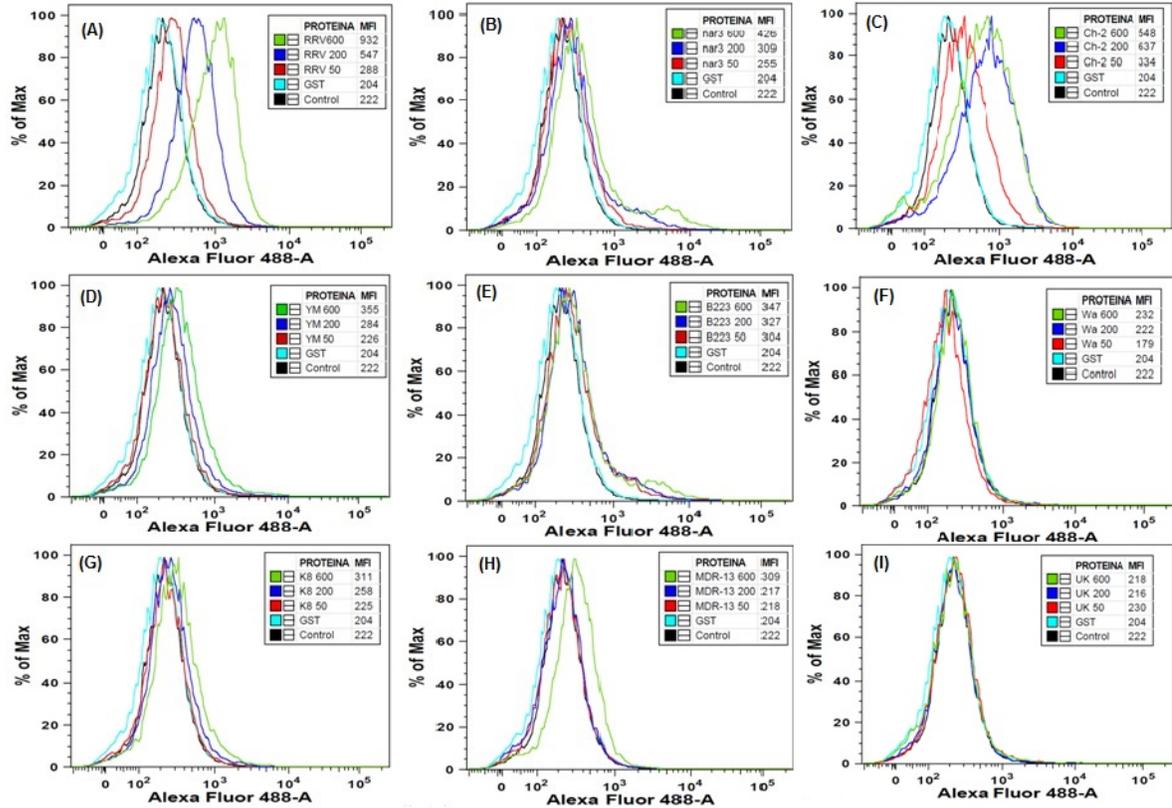
**Tabla 5. Resumen de resultados de Hemaglutinación y residuos involucrados en el sitio de unión al AS**

Cepa	Origen	Genotipo [P]	Genogrupo	HA	Unión a AS terminales	101	155	157	187	188	189	190
RRV	Simio	3	I	+	+	R	Y	P	K	Y	Y	S
YM	Porcino	7	I	+	+	R	H	P	E	Y	Y	S
Ch2-ibt	Aviar	17	V	+	+	K	I	E	G	Y	Y	T
B223	Bovino	11	IV	+	-	F	R	Y	G	T	Y	S
Nar3	Simio	3	I	-	-	R	Y	P	R	Y	Y	S
UK	Bovino	5	I	-	-	R	W	T	K	G	Y	F
MDR-13	Porcino	13	I	-	-	I	Y	T	W	G	Y	T
Wa	Humano	8	II	-	-	F	R	T	D	S	S	S
K8	Humano	9	III	-	-	R	Y	T	S	Y	Y	L

### 6.3 Ensayos de unión a células MA104 utilizando Citometría de Flujo

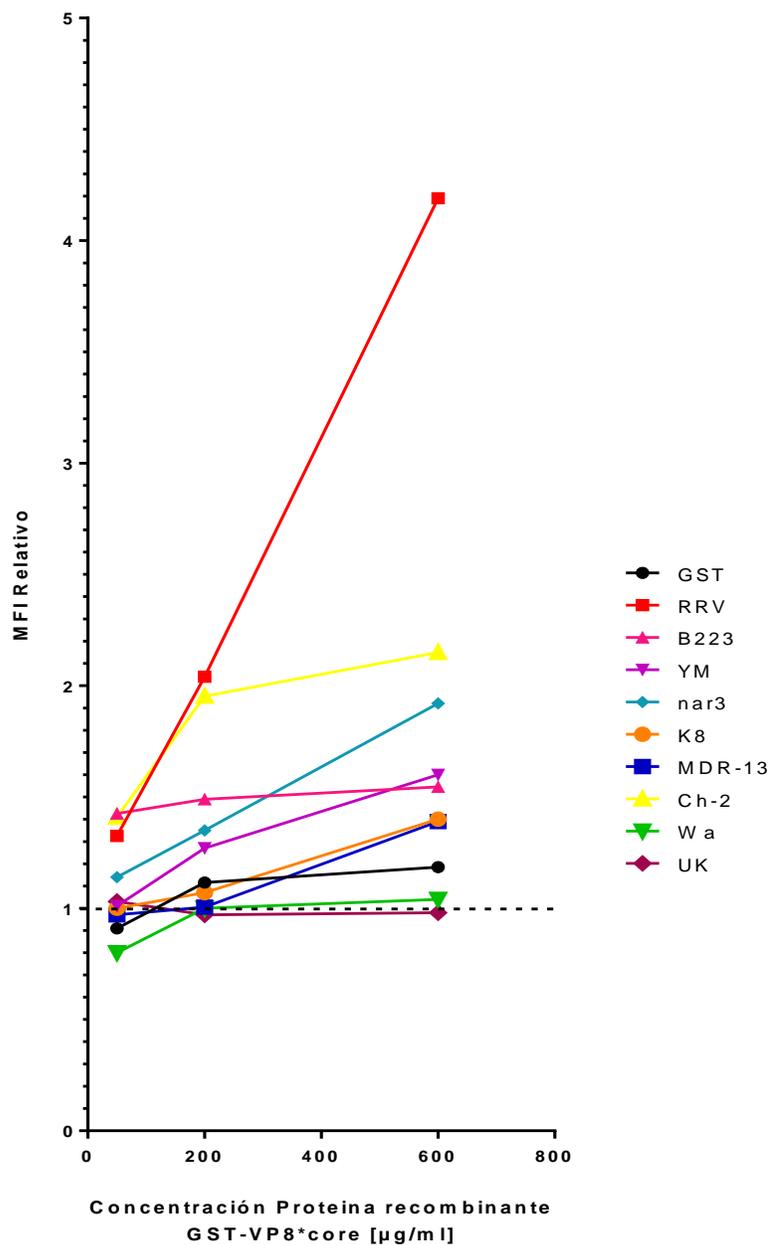
Para determinar si efectivamente las proteínas recombinantes GST-VP8\*core se unen a las células MA104 se realizaron ensayos de unión con células mediante citometría de flujo. Se utilizaron 3 concentraciones diferentes de proteína recombinante (50 µg/ml, 200 µg/ml, 600 µg/ml) y las proteínas se detectaron con un anticuerpo monoclonal específico para GST, y un anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a Alexa 488. La unión de las proteínas GST-VP8\*core con células se analizó mediante el Software BD FACS Diva (FlowJo v9.3.3) y se calculó la Intensidad de Fluorescencia Media (MFI). Con estos datos se realizó un gráfico que muestra el MFI relativa (dividiendo el MFI de la muestra entre el MFI control). Las proteínas recombinantes GST-VP8\*core mostraron diferencias en su unión con la membrana celular: las proteínas de las cepas RRV, Ch2-ibt, nar3, YM y B223 mostraron unión a las 3 concentraciones probadas, mientras que las proteínas de las cepas Wa y UK no muestran unión en ninguna de las concentraciones utilizadas. Las proteínas de las cepas restantes K8 y MDR-13, mostraron unión solamente a la concentración más alta (600 µg/ml). El GST y células sin preincubar con proteínas fueron utilizadas como control negativo (**Figura 20 y 21**).

La proteína recombinante GST-VP8\*core de la cepa RRV muestra una afinidad mayor a las células MA104 en comparación con las otras cepas analizadas, seguido de las cepas Ch2-ibt y la variante nar3.



**Figura 20. Unión de la proteína GST-VP8\*core a células MA104.** Histogramas que representan mediante la Intensidad de Fluorescencia de Alexa 488 la unión de la proteína recombinante GST-VP8\*core a células MA104 utilizando 3 concentraciones diferentes de proteína (50, 200 y 600 µg/ml). **(A)** RRV **(B)** nar3 **(C)** Ch-2 **(D)** YM **(E)** B223 **(F)** Wa **(G)** K8 **(H)**MDR-13 **(I)** UK.

**Ensayos de Unión de la proteína GST-VP8\*core a células MA104**



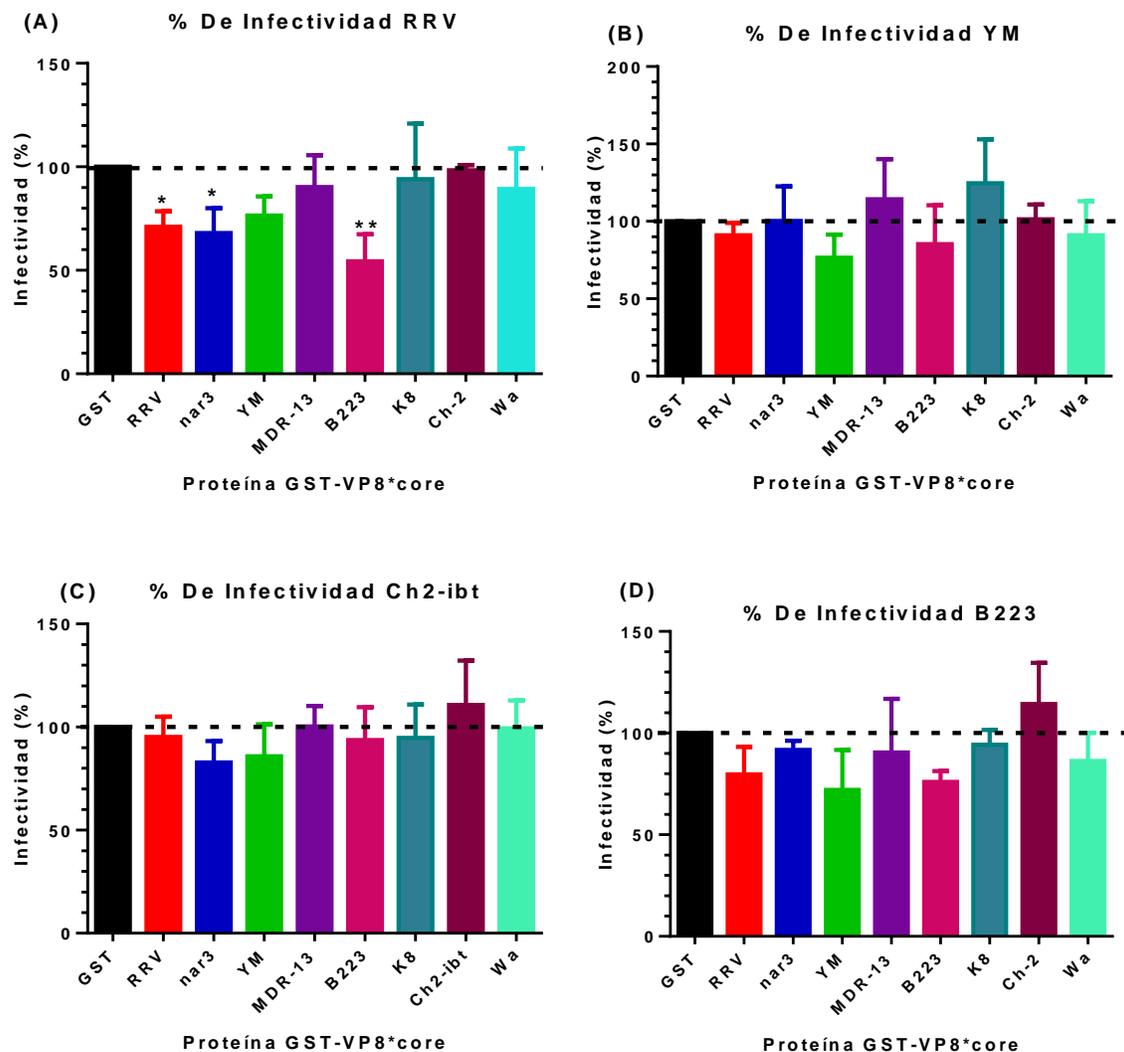
**Figura 21. Ensayo de unión de la proteína VP8\* core a células MA104.** 9 proteínas VP8\*core de rotavirus y GST como control negativo fueron incubadas con células MA104 a 3 concentraciones diferentes (50 µg/ml, 200 µg/ml, 600 µg/ml) durante 1 hora en hielo. Se muestra la relación de la Media Geométrica de Fluorescencia de Alexa 488 en comparación con células MA104 sin tratar.

#### 6.4 Bloqueo de la infectividad con la proteína recombinante GST-VP8\*core

Con la finalidad de comparar el uso de receptores entre diferentes cepas de rotavirus se han realizado experimentos de bloqueo de la infectividad de distintas cepas de rotavirus con las proteínas GST-VP8\*core purificadas. La idea es que en el caso de que dos virus utilicen el mismo ligando, sus proteínas VP8\*core tendrían la capacidad de bloquear la infectividad de manera cruzada.

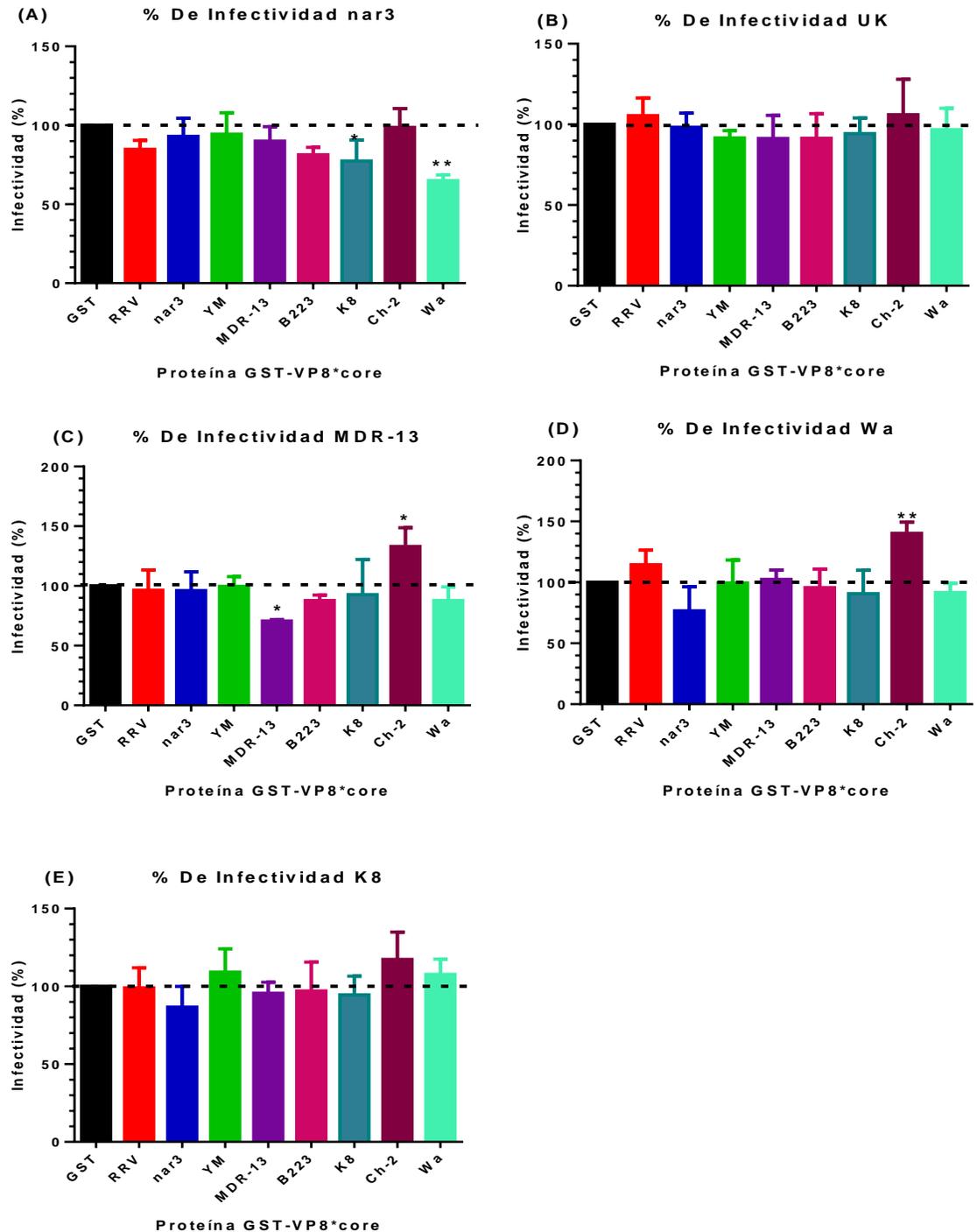
La preincubación de las proteínas recombinantes con las células previo a la infección afectó la infectividad de varias cepas de rotavirus que mostraron la actividad de hemaglutinación (**Figura 22**). De manera específica la infectividad de la cepa RRV fue afectada de manera significativa por la proteína GST-VP8\*core de la cepa sensible a NA RRV, por la proteína de la variante nar3 y por la proteína GST-VP8\*core de la cepa B223. La inhibición observada con la proteína RRV es esperada, ya que es una cepa que reconoce a AS terminales. El bloqueo con las proteínas de la variante nar3 y la cepa B223 no fue esperado, ya que la proteína GST-VP8\*core de la variante nar3 no hemaglutinó (por lo tanto no interacciona con AS terminales) y la proteína GST-VP8\*core de la cepa B223 se conoce que interacciona con el precursor H tipo II [Ramani, 2013], sugiriendo que la inhibición es dada por un impedimento estérico (**Figura 22A**).

La infectividad de la cepa YM no fue inhibida significativamente con ninguna proteína recombinante GST-VP8\*core (**Figura 22B**). Es interesante que la proteína recombinante de la cepa RRV no inhibiera la infectividad de este virus. Con respecto a las otras dos cepas, la infectividad de la cepa aviar Ch2-ibt tampoco fue disminuida significativamente con ninguna proteína GST-VP8\*core, interesantemente la infectividad no es disminuida con las proteínas recombinantes de la cepa RRV y YM (NA-sensibles) lo que sugiere que a pesar de observar el reconocimiento a AS en los ensayos de hemaglutinación, la unión a AS no es importante para llevar a cabo una infectividad productiva. Además la proteína recombinante GST-VP8\*core de su misma cepa Ch2-ibt tampoco disminuyó su infectividad lo que podría sugerir que esta cepa podría utilizar más de un receptor distinto para entrar a la célula (**Figura 22C**). La infectividad de la cepa B223 no disminuye de manera significativa con alguna proteína GST-VP8\*core, sin embargo se observa una pequeña disminución del 20% con su misma proteína recombinante (**Figura 22D**).



**Figura 22. Efecto de la preincubación de proteínas recombinantes GST-VP8\*core sobre la infectividad de cepas HA+.** Porcentaje de infectividad obtenido al infectar células MA104 con 4 cepas diferentes de rotavirus individualmente (RRV, YM, Ch-2 y B223) preincubadas con 8 diferentes proteínas GST-VP8\*core, 14 horas postinfección se realizó la detección de focos infecciosos (Figuras A-D). Los resultados están referidos al número de focos obtenidos en el tratamiento control (GST). Se muestran las medias aritméticas más desviación estándar de tres experimentos independientes (n=3) por duplicado. Los asteriscos indican diferencia significativas entre la infectividad de cada cepa preincubadas con las diferentes proteínas (\*P≤ 0.05; \*\*P≤ 0.01).

Con respecto a la inhibición de la infectividad de los virus que no hemaglutinaron (**Figura 23**), se observó que la infectividad de las cepas UK y K8 no se vio afectada con ninguna proteína GST-VP8\*core probada (Figura 23B y 23E). La infectividad de la variante nar3 fue inhibida de manera significativa al ser preincubada con la proteína recombinante de las cepas K8 y Wa (Figura 23A). La inhibición con la proteína GST-VP8\*core de la cepa Wa es inesperada, ya que esta proteína no interaccionó con la superficie de células MA104 en los ensayos de citometría de flujo. La infectividad de la cepa MDR-13 fue afectada solamente con la preincubación con su propia proteína, mientras que la infectividad de la cepa Wa no fue afectada con la preincubación de la proteína GST-VP8\*core de ninguna cepa (Figura 23C y 23D). De manera interesante, la infectividad de las cepas MDR-13, Wa y K8 aumentó después de la preincubación con la proteína GST-VP8\*core de la cepa aviar Ch2-ibt.



**Figura 23. Efecto de la preincubación de proteínas recombinantes GST-VP8\*core sobre la infectividad de cepas HA-.** Porcentaje de infectividad obtenido al infectar células MA104 con 5 cepas diferentes de rotavirus individualmente (nar3, UK, MDR-13, Wa y K8) preincubadas con 8 diferentes proteínas GST-VP8\*core, 14 horas postinfección se realizó la detección de focos infecciosos (Figuras A-E). Los resultados están referidos al número de focos obtenidos en el tratamiento control (GST). Se muestran las medias aritméticas más desviación estándar de tres experimentos independientes (n=3) por duplicado. Los asteriscos indican diferencia significativas entre la infectividad de cada cepa preincubadas con las diferentes proteínas (\*P≤ 0.05; \*\*P≤0.01).

En la **Tabla 6** se resumen los resultados de los ensayos de bloqueo de la infectividad mostrando las proteínas que disminuyen la infectividad de las cepas en un 20% o más. Se observan en azul las proteínas de las cepas que hemaglutinaron y en rojo las proteínas de las cepas que no hemaglutinaron.

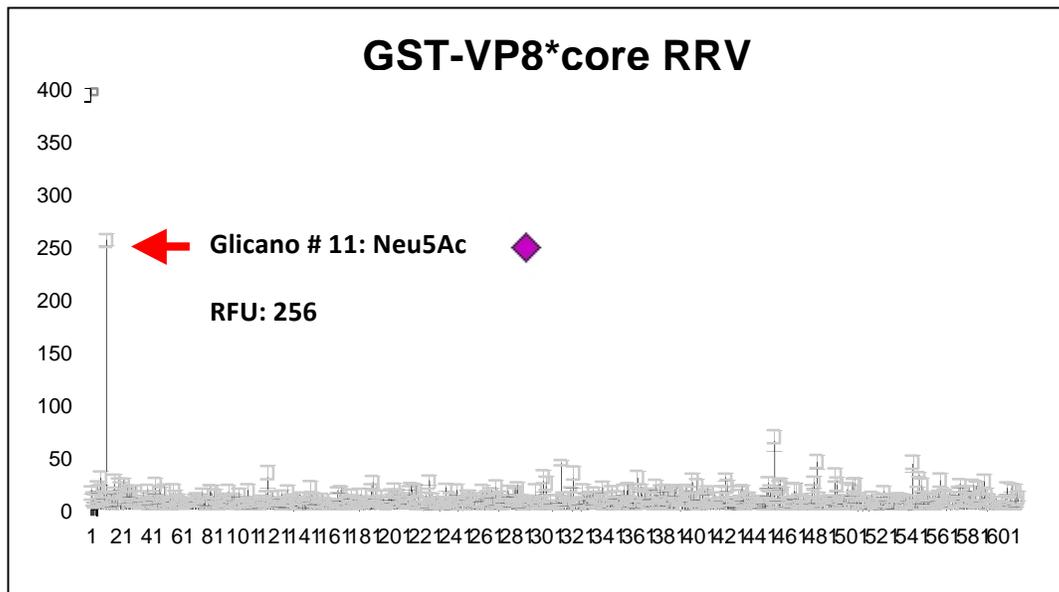
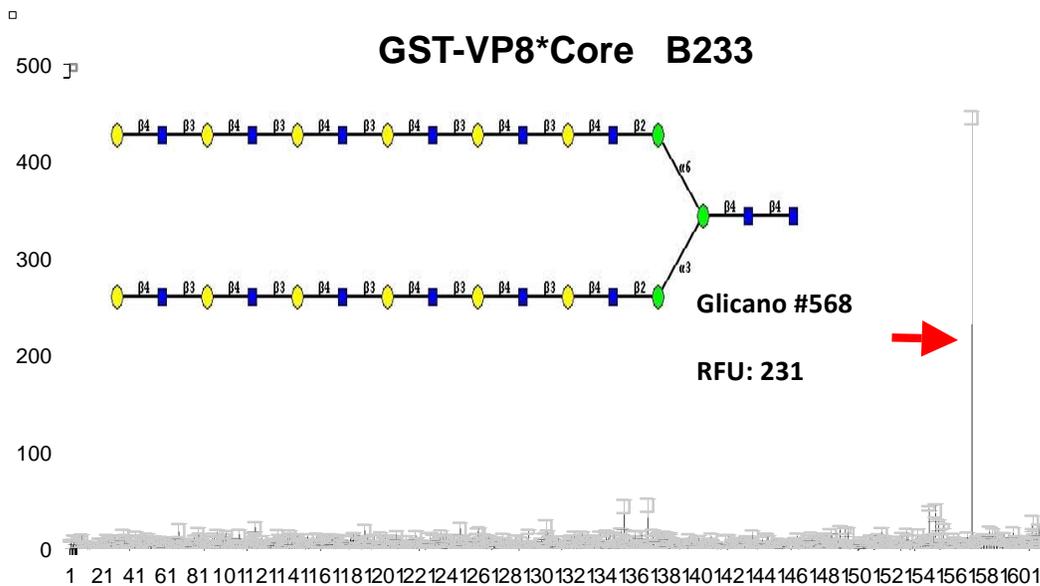
**Tabla 6. Resumen del efecto en la Infectividad de diferentes cepas preincubando células MA104 con proteínas recombinante GST-VP8\*core**

Cepa	Origen	Genotipo P	Genogrupo	HA	Proteínas que Disminuyen la Infectividad		Proteínas que Aumentan la infectividad	
RRV	Simio	3	I	+	B223	50%		
					nar3	30%		
					YM	30%		
					RRV	30%		
YM	Porcino	7	I	+	YM	20%		
Ch2-ibt	Aviar	17	V	+	nar3	20%		
B223	Bovino	11	IV	+	RRV	20%		
					YM	20%		
					B223	20%		
nar3	Simio	3	I	-	RRV	20%		
					B223	20%		
					K8	20%		
					Wa	30%		
UK	Bovino	5	I	-				
MDR-13	Porcino	13	I	-	MDR-13	30%	Ch2-ibt	30%
Wa	Human o	8	II	-	nar3	20%	Ch-2-ibt	30%
K8	Human o	9	III	-			Ch2-ibt	20%

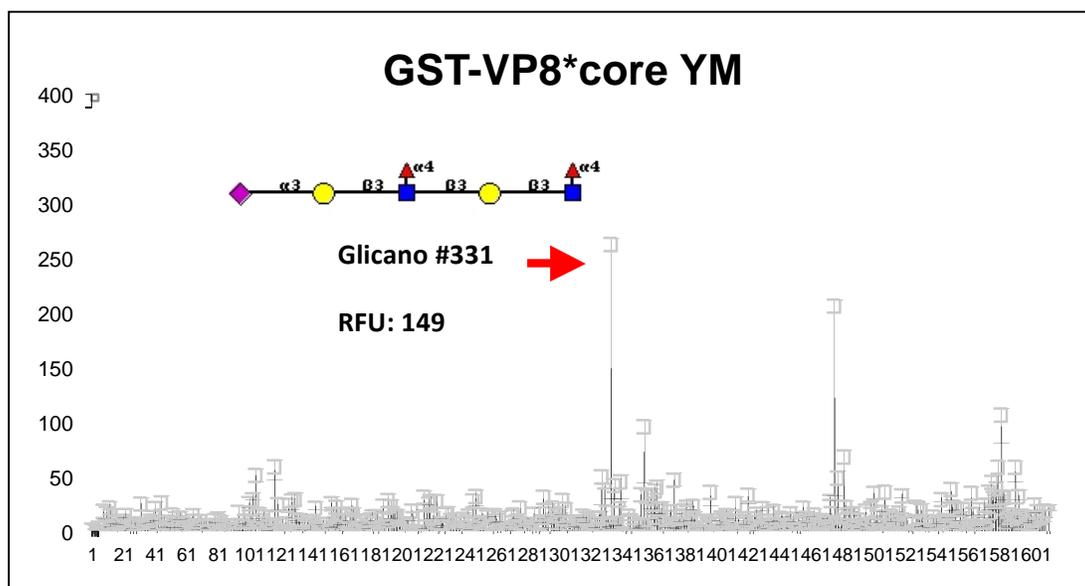
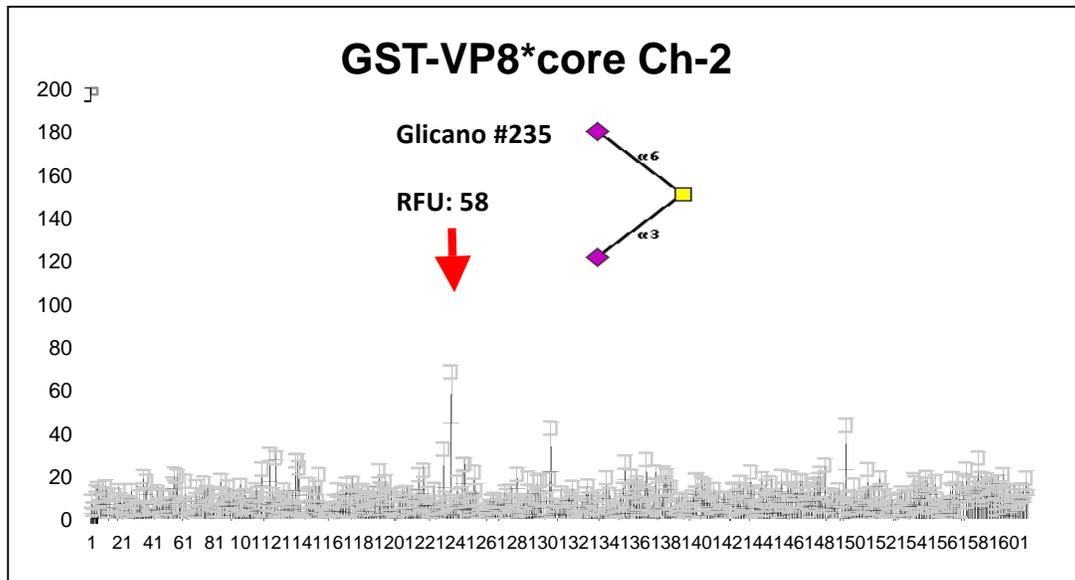
## 6.5 Interacción de la proteína recombinante GST-VP8\*core con un panel de glicanos.

Una vez corroborada la funcionalidad de las proteínas GST-VP8\*core con los ensayos anteriores, las proteínas fueron enviadas al “Consortium for Functional Glycomics, Protein-Glycan Interaction Core-H, Emory University School of Medicine” para analizar la unión de las proteínas con un panel de más de 600 glicanos. Para el análisis se utilizó una concentración de 200µg/ml de la proteína recombinante GST-VP8\*core y las proteínas fueron detectadas usando un anticuerpo monoclonal anti GST (Sigma) marcado con un fluoróforo. La fuerza de unión al glicano fue expresada en términos de Unidad de Fluorescencia Relativa (RFU). En las **Figuras 24 y 25** se muestran los resultados obtenidos con las proteínas que hemaglutinaron. Por razones desconocidas los valores de interacción obtenidos fueron más bajos que los observados anteriormente por el “Consortium for Functional Glycomics”.

Se observa que las proteínas GST-VP8\* de las cepas analizadas se unen con un mayor valor de RFU a glicanos diferentes, la proteína de la cepa B223 lo hace al precursor H tipo II, la proteína de la cepa RRV lo hace al *Neu5Ac* (AS) (**Figura 24**), y las proteínas de las cepas YM y Ch2-ibt lo hacen a un glicano que contiene residuos de AS terminales (**Figura 25**).

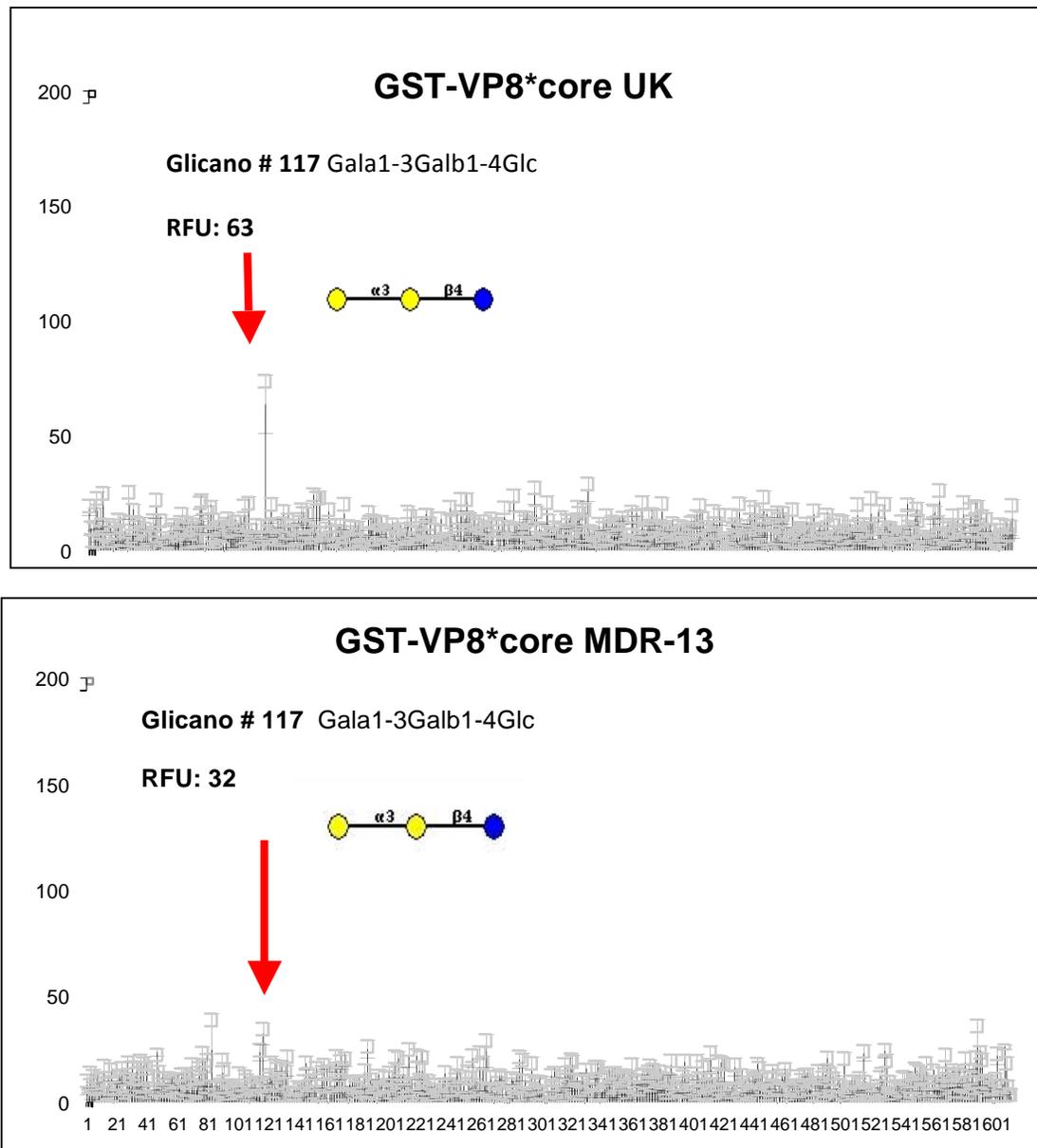


**Figura 24. Ensayo de unión de la proteína GST-VP8\*core de las cepas B23 y RRV a un panel de glicanos.** Las proteínas recombinantes GST-VP8\*core fueron detectadas usando un anticuerpo monoclonal anti GST (Sigma) marcado con un fluoróforo. La fuerza de unión al glicano fue expresada en términos de Unidades de Fluorescencia Relativa (RFU). En la figura se muestra la estructura del glicano al que se une la proteína recombinante con el mayor número de RFU.

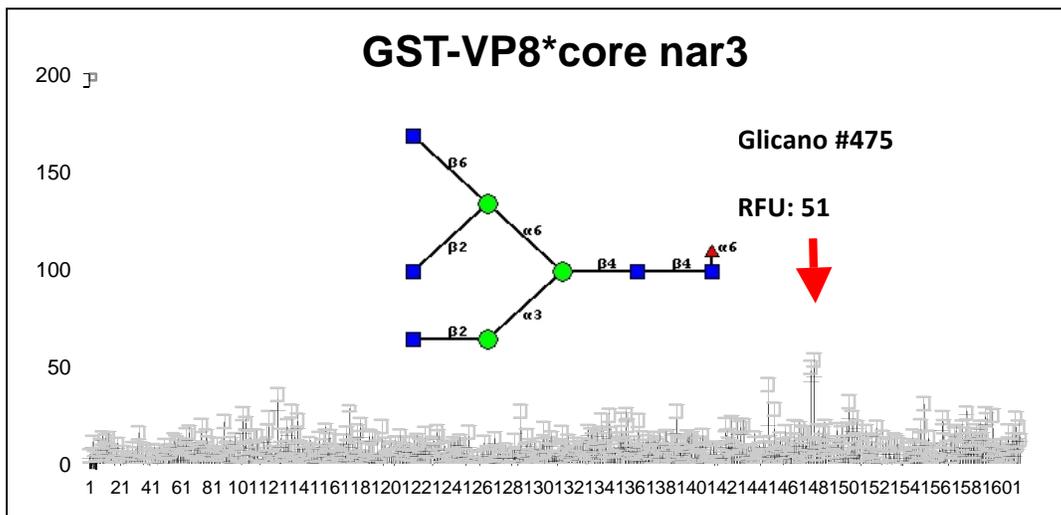
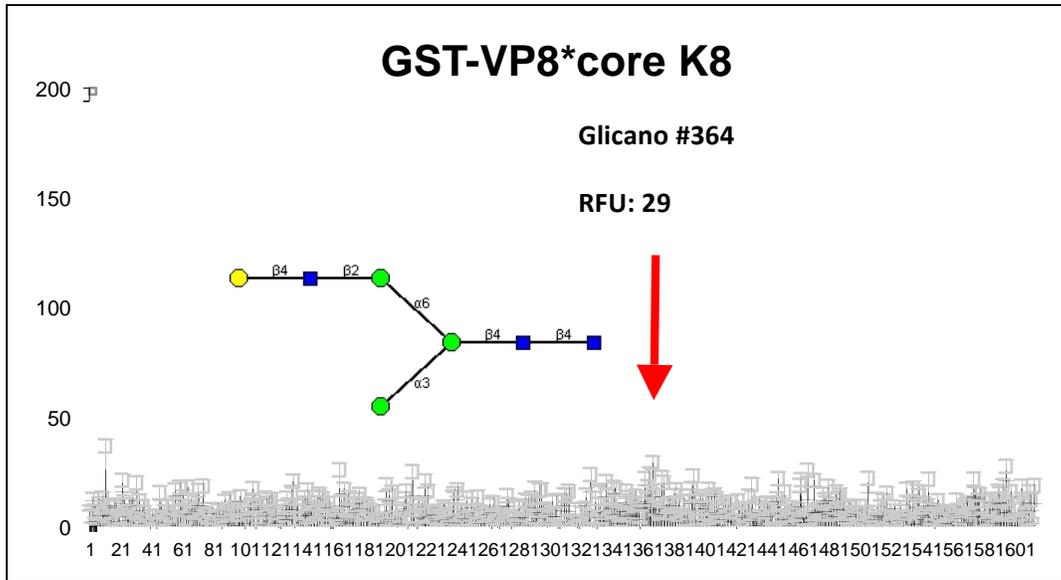


**Figura 25. Ensayo de unión de la proteína GST-VP8\*core de las cepas Ch-2 y YM a un panel de glicanos.** Las proteínas recombinantes GST-VP8\*core fueron detectadas usando un anticuerpo monoclonal anti GST (Sigma) marcado con un fluoróforo. La fuerza de unión al glicano fue expresada en términos de Unidades de Fluorescencia Relativa (RFU). En la figura se muestra la estructura del glicano al que se une la proteína recombinante con el mayor número de RFU.

Con respecto a las proteínas que no hemaglutinaron, las proteínas recombinantes GST-VP8\*core de las cepas UK y MDR-13 se unieron con un mayor valor de RFU (primer hit) al mismo glicano *Gala1-3Galb1-4Glc* (Isoglobiotrosa) (**Figura 26**). La proteína recombinante GST-VP8\*core de la cepa K8 reconoció como el mejor hit a un glicano que contiene al precursor H tipo II en su cadena y la proteína recombinante de nar3 reconoció a un glicano que no contiene ningún residuo de AS en su cadena (**Figura 27**).



**Figura 26. Ensayo de unión de la proteína GST-VP8\*core de las cepas UK y MDR-13 a un panel de glicanos.** Las proteínas recombinantes GST-VP8\*core fueron detectadas usando un anticuerpo monoclonal anti GST (Sigma) marcado con un fluoróforo. La fuerza de unión al glicano fue expresada en términos de Unidades de Fluorescencia Relativa (RFU). En la figura se muestra la estructura del glicano al que se une la proteína recombinante con el mayor número de RFU.



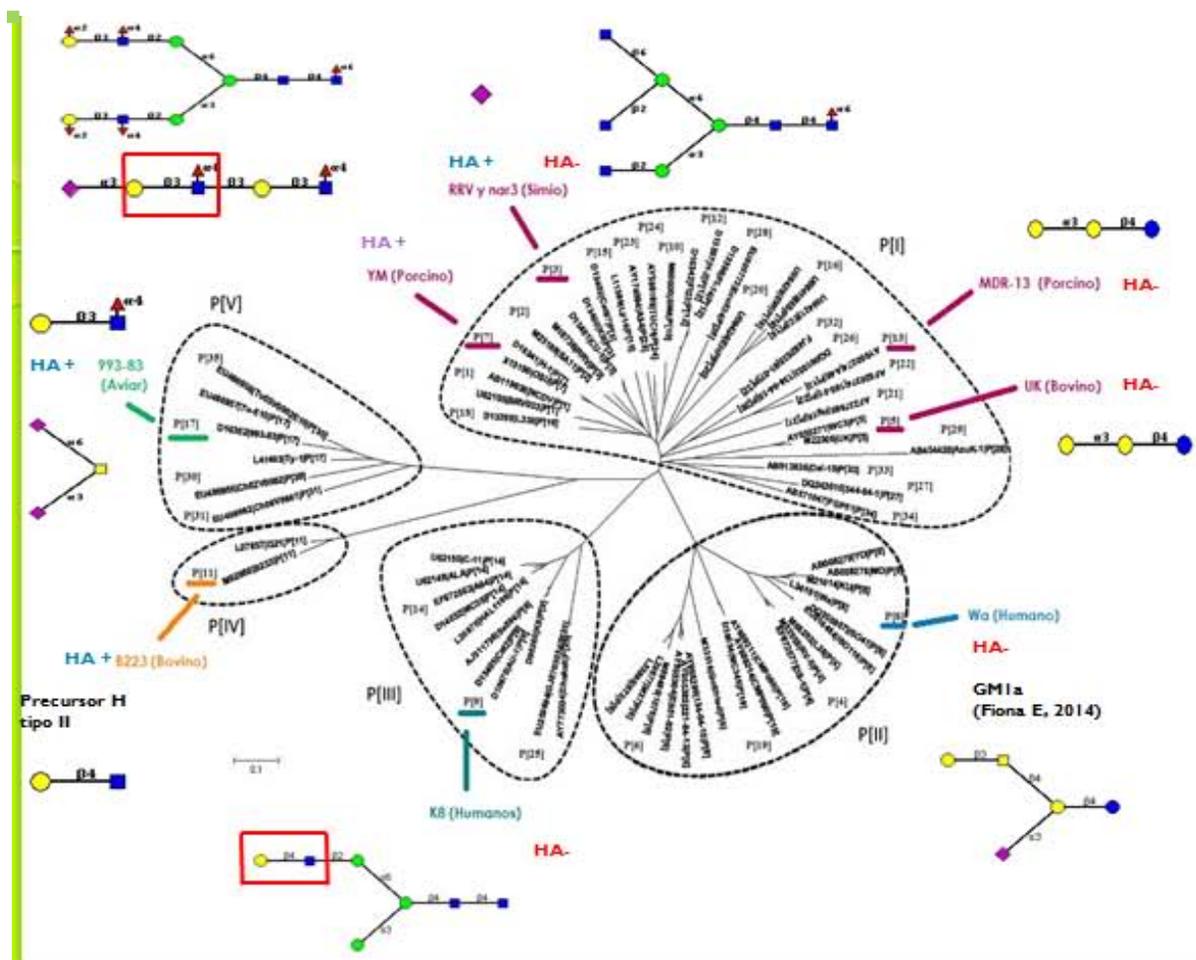
**Figura 27. Ensayo de unión de la proteína GST-VP8\*core de las cepas K8 y nar3 a un panel de glicanos.** Las proteínas recombinantes GST-VP8\*core fueron detectadas usando un anticuerpo monoclonal anti GST (Sigma) marcado con un fluoróforo. La fuerza de unión al glicano fue expresada en términos de Unidades de Fluorescencia Relativa (RFU). En la figura se muestra la estructura del glicano al que se une la proteína recombinante con el mayor número de RFU.

Los tres primeros hits de interacción con glicanos de cada una de las proteínas GST-VP8\*core se muestran la **Tabla 7**.

**Tabla 7. Glicanos que se unen a la proteína GST-VP8\*core de las diferentes cepas de rotavirus.**

Proteína GST-VP8* core	# Glicano	Nombre	RFU
<b>RRV</b>	11	Neu5Acb	256
	450	Gala1-3(Fuca1-2)Galb1-4GlcNAcb1-6(Gala1-3(Fuca1-2)Galb1-4GlcNAcb1-3)GalNAc	66
	478	Neu5Aca2-3Galb1-4GlcNAcb1-2Mana	45
<b>B223</b>	568	Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-2Mana1-6(Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-2Mana1-3)Manb1-4GlcNAcb1-4GlcNAcb-Sp25	231
	541	Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-2Mana1-6(Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-2Mana1-3)Manb1-4GlcNAcb1-4GlcNAcb-Sp12	42
	545	GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-2Mana1-6(GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-2Mana1-3)Manb1-4GlcNAcb1-4GlcNAcb-Sp12	37
<b>YM</b>	331	Neu5Aca2-3Galb1-3(Fuca1-4)GlcNAcb1-3Galb1-3(Fuca1-4)GlcNAcb-Sp0	149
	473	Fuca1-2Galb1-3(Fuca1-4)GlcNAcb1-2Mana1-6(Fuca1-2Galb1-3(Fuca1-4)GlcNAcb1-2Mana1-3)Manb1-4GlcNAcb1-4(Fuca1-6)GlcNAcb1-4(Fuca1-6)GlcNAcb-Sp19	123
	579	Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-2Mana1-6(Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-2Mana1-3)Manb1-4GlcNAcb1-4(Fuca1-6)GlcNAcb-Sp24	96
<b>Ch-2</b>	235	Neu5Aca2-6(Neu5Aca2-3)GalNAca-Sp8	58
	492	(3S)Galb1-3(Fuca1-4)GlcNAcb-Sp0	35
	300	Galb1-3Galb1-4GlcNAcb-Sp8	33
<b>UK</b>	117	Gala1-3Galb1-4Glc-Sp10	63
	330	Neu5Aca2-6Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-3GlcNAcb-Sp0	26
	295	Neu5Aca2-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-3GlcNAcb-Sp0	25
<b>K8</b>	364	Galb1-4GlcNAcb1-2Mana1-6(Mana1-3)Manb1-4GlcNAcb1-4GlcNAcb-Sp12	29
	11	Neu5Acb-Sp8	26
	592	Neu5Aca2-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3GalNAca-Sp14	26
<b>MDR-13</b>	117	Gala1-3Galb1-4Glc-Sp10	32
	588	Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-6(Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-2)Mana1-6(Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-2)Manb1-4GlcNAcb1-4(Fuca1-6)GlcNAcb-Sp24	26
	606	Neu5Aca2-6Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-2Mana1-6(Neu5Aca2-6Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-2)Manb1-4GlcNAcb1-4GlcNAcb-Sp12	26
<b>nar3</b>	475	GlcNAcb1-6(GlcNAcb1-2)Mana1-6(GlcNAcb1-2)Manb1-4GlcNAcb1-4(Fuca1-6)GlcNAcb-Sp24	51
	473	Fuca1-2Galb1-3(Fuca1-4)GlcNAcb1-2Mana1-6(Fuca1-2Galb1-3(Fuca1-4)GlcNAcb1-2)Manb1-4GlcNAcb1-4(Fuca1-6)GlcNAcb1-4(Fuca1-6)GlcNAcb-Sp19	47
	124	Gala1-6Glc-Sp8	33

Para resumir los resultados, las proteínas GST-VP8\*core de los rotavirus parecen interactuar con diversos glicanos (**Figura 28**). Observamos que la proteína de la cepa B223 P[11] reconoce al precursor H tipo II, tal como se ha descrito anteriormente [Ramani, 2013]. Curiosamente la proteína GST-VP8\*core de la cepa K8 también interacciona con este precursor. Por otro lado las proteínas GST-VP8\*core de las cepas NA-sensibles y que hemaglutinaron interactúan con el AS (cepa RRV) o con un glicano que contiene AS terminales (Ch2-ibt y YM). Mientras que para las proteínas NA-resistentes, dos de ellas (UK y MDR-13) interactúan con la isoglobotriosa y una con un glicano que no contiene AS (variante nar3). Sin embargo, hay que mencionar que los valores de RFU son muy bajos para asegurar la veracidad.



**Figura 28. Modelo gráfico del árbol filogenético de la proteína VP8\* de rotavirus y el reconocimiento a Glicanos.** Se muestra la hemaglutinación de las proteínas recombinantes de las cepas utilizadas (HA+ y HA-) y su posición en el árbol filogenético, además del glicano al que reconocen representados en caricatura.

## 7. DISCUSIÓN

Entender la entrada de rotavirus a las células e identificar los receptores que utiliza para unirse a ella es particularmente relevante debido a que rotavirus es un importante patógeno y poder contrarrestar su unión y entrada sería de gran impacto clínico y económico.

Este trabajo se enfocó en evaluar la capacidad de reconocimiento de glicanos por la proteína VP8\*core de rotavirus. Si bien se han demostrado varios receptores celulares de rotavirus como AS, integrinas y gangliósidos [López & Arias, 2004; Guo, 1999; Delorme, 2011; Haselhorst, 2009; Martínez, 2012; Fiona E, 2014] y HBGAs [Huang 2012., Yu X, 2011., Hu L, 2012., Ramani, 2013 y Liu Y, 2013], no se ha hecho un estudio global para identificar los glicanos con los cuales interaccionan diversas cepas de rotavirus.

Para analizar la interacción de las proteínas recombinantes GST-VP8\*core con sus ligandos se utilizaron varios métodos. En primer lugar se analizó la capacidad de las proteínas GST-VP8\*core de hemaglutinar los eritrocitos de tipo sanguíneo A, B y O. Se encontró que las cepas que hemaglutinaron los tres tipos sanguíneos son RRV, YM, B223 y Ch2-ibt. Se sabe que RRV y YM son cepas NA sensibles, es decir su infectividad se ve afectada al tratar las células con neuraminidasa y reconocen a los AS terminales que se encuentra en la membrana de los eritrocitos. Además la proteína GST-VP8\*core de la cepa B223 hemaglutina eritrocitos de cordón umbilical reconociendo al antígeno H tipo II [Ramani, 2013]. La hemaglutinación de la cepa aviar Ch-2 no había sido reportada previamente por lo que no se tenía un antecedente, sin embargo en ensayos de infectividad con la cepa Ch-2 se había observado que es NA resistente, es decir su infectividad no se ve disminuida al tratar a las células con NA [Ciarlet, 2002]. A pesar de que la cepa Ch-2 es una cepa NA resistente observamos que la proteína recombinante GST-VP8\*core de la cepa Ch2-ibt hemaglutina a una concentración similar que RRV, y la hemaglutinación es inhibida al remover los AS terminales con la NA, de manera parecida a las proteínas GST-VP8\*core de las cepas RRV y YM. Es interesante que la proteína GST-VP8\*core de la cepa B223 aumentó su hemaglutinación después de la remoción de los AS con la NA, lo cual concuerda con lo reportado por Ramani en 2013, que describe que al eliminar los AS de los eritrocitos, las proteínas GST-VP8\*core de esta cepa pueden unirse de manera más fácil a su receptor, el precursor H tipo II [Ramani, 2013].

Si comparamos las proteínas GST-VP8\*core de la cepa RRV y su variante nar3, la única diferencia a nivel de secuencia es que nar3 tiene una mutación en el aminoácido 187 (K187R), dándole el fenotipo de resistencia al tratamiento con NA [Mendez, 1993]. Dado que la proteína GST-VP8\*core de la variante nar3 no hemaglutina mientras que la proteína de la cepa original RRV tiene actividad de hemaglutinación podemos concluir que la mutación K187R causa la pérdida de la hemaglutinación. Anteriormente se ha observado que las partículas virales de la variante nar3 hemaglutinaron con eritrocitos humanos tipo O en un título parecido al de la cepa RRV [Mendez, 1993]. Esta variación podría ser resultado de las diferencias presentes entre la partícula viral de la variante nar3 y la proteína GST-VP8\*core expresada en este trabajo, ya que la partícula viral de la cepa nar3 contiene 3 mutaciones [(L37P), (K187R), (Y267C)] y la construcción GST-VP8\*core contiene solamente una (K187R). Estos resultados sugieren que el aminoácido 187 de la cepa RRV es importante para la unión de los AS terminales.

La pérdida de la capacidad de hemaglutinar debida a un cambio en un aminoácido ya se había observado en estudios previos con la cepa SA11, cuando una mutación en la posición 194 (Tyr por Cys) resultó en la abolición de la hemaglutinación [Zhou, 1994].

Anteriormente se ha descrito que el aminoácido 187 de la cepa CRW-8 (Gly187) es el mayor determinante que dicta la preferencia de la proteína VP8\* por el Acido N-glicolil neuraminico sobre el ácido N-acetil neuramínico y la preferencia de la cepa RRV (Lys187) por el N-acetil neuramínico [Yu, 2012]. Esto sugiere que el aminoácido 187 de la proteína VP8\* de la cepa RRV pudiera estar asociado con la especificidad, la afinidad y los efectos conformacionales en el sitio de unión, pareciendo dictar la vía de preferencia de internalización.

Anteriormente se ha descrito que la cepa porcina YM hemaglutina eritrocitos humanos tipo O [Mendez, 1999]. Por esta razón la baja capacidad de la proteína GST-VP8\*core para hemaglutinar eritrocitos fue sorprendente, requiriendo concentraciones de hasta 100 µg/ml. En este sentido es importante resaltar que la proteína que nosotros clonamos tiene una mutación en la posición 187 (E187G), lo cual podría modificar su especificidad para interactuar con el AS, aunque este cambio de aminoácido no abolió por completo la hemaglutinación como en el caso de la proteína VP8\*core de la cepa nar3.

Para determinar si las proteínas recombinantes GST-VP8\*core se unían a las células MA104 se realizó un ensayo de unión utilizando citometría de flujo. Se observó que la

proteína GST-VP8\*core de las cepas RRV, YM, Ch2-ibt, B223, nar3, K8, y MDR-13 es capaz de unirse a la célula mientras que la proteína GST-VP8\*core de las cepas Wa y UK no (Figura 24). Sin embargo, anteriormente se ha demostrado que las cepas de rotavirus Wa y UK interaccionan con el gangliósido GM1 (presente en la superficie de las células MA104) y que la proteína GST-VP8\*core de las cepas humanas Wa y RV-3 muestran unión a células MA104 en suspensión [Fiona, 2014]. Existen diferencias en la metodología de ambos trabajos, ya que en nuestro trabajo se preparó la suspensión de células MA104 usando PBS-EDTA, mientras que en el trabajo de Fiona se usó tripsina-EDTA. Esta segunda solución pudo haber digerido algunas proteínas membranales, facilitando la interacción entre VP8\*core y el gangliósido GM1. De manera parecida se observó que el tratamiento de las células con NA aumenta la infectividad y unión de cepas humanas [Fiona, 2014].

Con la finalidad de comparar el uso de receptores entre diferentes cepas de rotavirus se evaluó la infectividad de las nueve cepas de rotavirus en células MA104, preincubando de manera independiente las células con 200 µg/ml de proteína GST-VP8\*core, para de esta manera inducir un bloqueo de los receptores virales antes de llevarse la infección.

Ninguna proteína recombinante GST-VP8\*core tuvo la capacidad de bloquear la infectividad de una cepa viral completamente a la concentración utilizada. La infectividad de la cepa RRV es disminuida escasamente en un 30% con las proteínas GST-VP8\*core de su propia cepa RRV, en comparación con el 80% observado en ensayos de disminución de la infectividad, cuando se remueven los AS terminales presentes en la membrana celular con NA [Ciarlet, 1999], la diferencia puede ser causada a que es más complicado bloquear todas las moléculas sializadas presentes en la membrana de las células que cortar los AS terminales con la NA. Para poder observar datos más concluyentes sería necesario realizar una estandarización de la disminución de la infectividad de la cepa RRV utilizando varias concentraciones de la proteína recombinante, y realizar una curva de dependencia de dosis. A pesar de utilizar una sola concentración de proteína recombinante (200µg/ml) y no observar una disminución de la infectividad mayor al 50%, se pueden visualizar datos interesantes (**Tabla 6**).

Una vez demostrada la funcionalidad de nuestras proteínas recombinantes GST-VP8\*core mediante los experimentos antes descritos, los resultados obtenidos por el “Consortium for Functional Glycomics” nos brindaron una base teórica de los posibles glicanos que las diversas cepas de rotavirus utilizan para entrar a la célula. A continuación

se discuten los resultados obtenidos por cada cepa en los diferentes experimentos realizados.

### **Cepa de simio RRV P[3]**

La cepa animal más caracterizada es la cepa de simio RRV P[3], la cual ya ha sido cristalizada en unión con AS [Dormitzer, 2002], por lo cual esta cepa fue elegida como un control positivo en nuestros experimentos. El screening mostró en primer hit de unión al residuo Neu5Ac, el cual concuerda con lo descrito por Haselhorst en 2006, en donde se observa mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN) la unión de la proteína GST-VP8\*core de RRV con el Neu5Ac.

Los ensayos de bloqueo de la infectividad nos muestran que la infectividad de la cepa RRV se ve disminuida mayoritariamente con la proteína recombinante de la cepa B223, lo cual podría ser ocasionado por un impedimento estérico debido a la unión de la proteína GST-VP8\*core al precursor H tipo II, unión reportada en trabajos recientes por Ramani en 2013. Con la preincubación de la proteína GST-VP8\*core de la cepa YM (NA-sensible) que también reconoce moléculas sializadas, hubo una disminución de la infectividad del 30% aproximadamente, al igual que con la proteína recombinante de la cepa nar3, estos resultados son muy similares a los reportados por Méndez et al., en 1999 en donde realiza ensayos de competencia de la infectividad utilizando partículas virales de las cepas YM, nar3 y DS1xRRV (cepa que contiene VP4 de RRV), en estos ensayos él observa una disminución de la infectividad de la cepa DS1xRRV al preincubar con el virus de la cepa YM y nar3 como lo observado en este trabajo.

Es importante destacar que en los ensayos de bloqueo de la infectividad existe una competencia recíproca de las cepas nar3 y RRV a pesar de que existe una diferencia en el reconocimiento al AS observado en los ensayos de hemaglutinación, esto podría ser debido a la competencia por dos tipos de receptores cercanos encontrados en diferentes moléculas o inclusive en la misma.

### **Cepa bovina B223 P[11]**

La proteína GST-VP8\*core de la cepa B223 P[11] ya había sido analizada por el consorcio de glicanos en un trabajo anterior [Ramani, 2013]. Debido a esta razón elegimos como control positivo a esta cepa para realizar los ensayos de unión en el panel de glicanos. Los resultados mostraron que el glicano al que se unió la proteína GST-

VP8\*core de B223 con mayor RFU (**Tabla 7**) es el mismo glicano al que se une la proteína recombinante en el trabajo anterior. Sin embargo por motivos desconocidos el RFU obtenido en nuestro trabajo es significativamente menor al reportado por Ramani. A pesar de esto con base a los datos obtenidos por el consorcio referidos a la proteína recombinante de la cepa RRV y B223, en donde se identificó los glicanos que efectivamente ambas cepas reconocen, es posible extrapolar los datos obtenidos en el consorcio para las demás proteínas y poder sugerir nuevos ligandos.

### **Cepa bovina YM P[7]**

El reconocimiento de glicanos como receptores no había sido evaluado para la cepa porcina YM P[7], sin embargo sí se había evaluado el reconocimiento de glicanos de dos cepas porcinas CRW-8 y OSU, pertenecientes al mismo genotipo P[7], en donde se observa que la cepa CRW-8 reconoce al gangliósido GD1a y la cepa OSU al gangliósido GM3, ambos con residuos de AS terminales [Rolsma, 1998; Haselhorst, 2009]. Los resultados de este trabajo muestran que al igual que estas dos cepas, la proteína GST-VP8\*core de la cepa YM reconoce a un glicano con un residuo de AS terminal, esto con base en los resultados obtenidos en la hemaglutinación y en la disminución de la hemaglutinación posterior al tratamiento con NA. Por otro lado la infectividad no se vio afectada después de la preincubación con ninguna proteína recombinante sugiriendo que esta cepa tiene un receptor particular que contiene residuos de AS no reconocidos por otras cepas. La hipótesis fue reforzada con los datos observados en los ensayos de unión con el panel de glicanos ya que se encontró que el primer hit obtenido es un glicano sialidado en la parte externa de la molécula, la cual no fue reconocida por ninguna otra proteína GST-VP8\*core en este estudio, además de tener un segundo hit con un valor muy parecido al primero, un glicano que contiene al antígeno de Lewis b (Le<sup>b</sup>), sugiriendo que la cepa YM tiene una afinidad similar a los dos receptores.

### **Cepa aviar Ch2-ibt P[17]**

Una de las cepas más interesantes fue la cepa aviar Ch2-ibt P[17] debido a que como se observó en los ensayos de hemaglutinación reconoce a los AS presentes en la membrana de los eritrocitos, sin embargo los ensayos de inhibición de la infectividad muestran que la infectividad de la cepa Ch2-ibt no es disminuida con las proteínas recombinantes de la cepa RRV y YM sugiriendo que la unión a AS no es importante para llevar a cabo una infectividad productiva. Los resultados obtenidos por el Consorcio de

glicanos con la proteína Ch2-ibt identificaron como primer hit (58 RFU) un glicano que contiene dos residuos de AS terminales, lo cual concuerda con los resultados de hemaglutinación observados. El segundo hit (35 RFU) es el antígeno de Lewis a (Le<sup>a</sup>). El reconocimiento al antígeno de Le<sup>a</sup> podría corroborar la hipótesis de que existe algún otro receptor distinto para entrar a la célula el cual no se encuentra sialidado.

### **Cepa nar3 P[3]**

Con respecto a la cepa nar3 se observa que su infectividad se ve afectada después de la preincubación con la proteína GST-VP8\*core de la cepa Wa. En ensayos de competencia de la infectividad realizados por Mendez et al, 1999 se observa un efecto similar al descrito por nosotros, en donde la infectividad de la cepa nar3 es disminuida con la preincubación de la cepa Wa, sin embargo en este mismo trabajo la infectividad de la cepa Wa se ve aumentada cuando se preincuban las células MA104 con la cepa nar3, contrario a lo observado en nuestro trabajo, por lo que es posible que la única mutación que contiene nuestra proteína GST-VP8\*core de la cepa nar3 (K187R) sea la responsable de esta diferencia en la competencia mostrada. Esto podría estar relacionado con la pérdida de hemaglutinación de la variante nar3, ya que en el trabajo de Mendez et al. (1999) la unión a AS pudo inducir una cascada de señalización en la célula que provocó un aumento en la endocitosis o en la replicación de la cepa Wa [Mendez et al, 1999]. Al abolir la hemaglutinación de nuestra proteína GST-VP8\*core de nar3, eliminamos el reconocimiento al AS lo que pudo provocar que la infectividad de la cepa Wa no aumentara al preincubar con la proteína GST-VP8\*core de nar3 como se describió anteriormente. En los ensayos de unión con el panel que contiene más de 600 glicanos se observó que el primer hit de unión fue una molécula no sialidada, resultado que correlaciona con lo antes descrito.

### **Cepa porcina MDR-13 P[13]**

El reconocimiento de glicanos de la cepa porcina MDR-13 P[13] no ha sido descrito anteriormente. En nuestro trabajo se observa que su infectividad es disminuida en un 30% únicamente con la proteína recombinante de su misma cepa MDR-13, lo cual nos sugiere que esta cepa reconoce a un receptor en particular que ninguna de las otras cepas analizadas en este trabajo reconoce. En el ensayo de reconocimiento de glicanos observamos que la proteína recombinante de la cepa MDR-13, al igual que la cepa UK como se mencionara más adelante, reconocen al mismo glicano: Gala1-3Galb1-4Glc

(Isoglobotriosa), el cual es un trisacárido presente en el calostro y leche materna de bovinos, ovejas, cabras y otras especies, que no se encuentran en leche materna o calostro humano [Urashima et al, 2001]. Esto sugiere que el reconocimiento a este receptor estaría correlacionado con la especie de origen.

### **Cepa bovina UK P[5]**

Refiriéndonos a la cepa UK la infectividad de esta cepa no se ve disminuida con la preincubación con ninguna de las proteínas utilizadas. A pesar de que se ha descrito por Delorme en 2001 que podría unirse al gangliósido GM1 al igual que la cepa Wa, en nuestros ensayos no se observó un bloqueo de la infectividad de manera cruzada como se esperaría. Esto podría deberse a que nuestro ensayo de inhibición de la infectividad no fue muy sensible dado que no hubo un bloqueo con proteínas GST-VP8\*core homólogas (su misma proteína). De igual manera no parece haber un reconocimiento de los receptores de manera cruzada entre las cepas UK y MDR-13, que como se mencionó anteriormente ambas cepas reconocieron al glicano Gala1-3Galb1-4Glc (Isoglobotriosa). Si observamos el árbol filogenético propuesto por Yang Liu en 2012 podemos ver que estas dos cepas pertenecen al mismo genogrupo y se encuentran cercanas en el árbol filogenético.

### **Cepa humana K8 P[9]**

Las interacciones de la proteína GST-VP8\*core de la cepa humana K8 P[9] con glicanos no habían sido estudiadas anteriormente, sin embargo sí se había evaluado la unión con glicanos de otra cepa perteneciente al mismo genotipo, la cepa T152 P[9] [Liu, 2012]. Mediante estudios de unión con lectinas presentes en saliva se observó la interacción con el antígeno tipo A [Liu, 2012]. Al observar el screening de glicanos podemos ver que esta proteína se une a un glicano que contiene al precursor H tipo II al igual que la proteína GST-VP8\*core de la cepa B223. Por otro lado también observamos que la cepa K8 en los estudios de bloqueo no se ve afectada en su infectividad al preincubar las células con las proteínas recombinantes de ninguna de las cepas, lo cual podría sugerir que al igual que las cepas UK, MDR-13, Ch2-ibt y YM, la cepa K8 pudiera tener más de un receptor celular.

Es importante mencionar que el tag GST no afecta la interacción entre el glicano y la proteína ya que en ninguno de nuestros experimentos observamos una interacción entre

la proteína GST y las células. Además de que en otros trabajos se han hecho experimentos con la proteína VP8\* sin el tag de GST y se observan resultados similares a cuando la proteína lo contiene [Fiona E, 2014]. Por otro lado el ensayo de unión al panel de glicanos de la proteína GST-VP8\*core de la cepa Wa no se realizó debido a que en el consorcio no se visualizó la proteína GST-VP8\*core en un gel de acrilamida teñido con azul de comassie, posiblemente debido a que la proteína se degradó en su transporte.

En los experimentos de bloqueo de la infección con proteínas GST-VP8\*core observamos un aumento en la infectividad de la cepa MDR-13 y las dos cepas humanas Wa y K8 al preincubar con la proteína recombinante GST-VP8\*core de la cepa Ch2-ibt. Como se observó en los ensayos de hemaglutinación, la cepa Ch2-ibt reconoce al AS, por lo que una posible explicación del aumento en la infectividad es que esta unión podría desencadenar una respuesta celular que cause que la célula entre en un estado “activado” que facilite la replicación o active una vía de señalización que facilite la endocitosis de las cepas Wa, K8 y MDR-13. El aumento de la infectividad de la cepa Wa después del bloqueo con las cepas de rotavirus nar3 y YM (partículas virales que reconocen al AS) ya ha sido reportada previamente [Mendez et al, 1999]. Un aumento de la infectividad similar se ha reportado para el virus de Hepatitis B, en donde partículas subvirales inactivadas causan el incremento en la infectividad de los virus cuando estas partículas son preincubadas con las células. En este sistema el aumento depende de la presencia del dominio de unión viral en partículas inactivadas [Bruns, 1998], tal como el utilizado por nosotros, en donde utilizamos el dominio de unión VP8\*core de rotavirus. Además se ha visto que la infectividad de reovirus en cultivos celulares es aumentada con la activación de la vía de señalización de Ras [Strong, 1998]. Y esta vía pudo haber sido activada por la posible interacción de la proteína GST-VP8\*core de Ch2-ibt con el factor de crecimiento epidermal.

En general podemos decir que la mayoría de las cepas de rotavirus evaluadas en este trabajo se unen a una gran variedad de moléculas presentes en células permisivas MA104 a través de su proteína VP8\*core. Es posible que durante las etapas tempranas de la infección exista una serie de interacciones secuenciales entre rotavirus y moléculas de la superficie celular como se había sugerido por Guerrero en el 2000, en donde los receptores de rotavirus están presentes en un complejo celular de muchos componentes asociados a balsas lipídicas, incluidos gangliósidos, glicoproteínas y que es necesaria una

organización para que el virus pueda unirse eficientemente e internalizarse [Guerrero, 2000].

A pesar de que al observar la unión de la proteína GST-VP8\*core con los glicanos en el microarreglo no se predice una replicación productiva del virus en células del intestino y que no se encontró una segregación clara en el reconocimiento a glicanos dependiente del genogrupo, este trabajo da una comprensión y un acercamiento a la identificación de posibles glicanos que rotavirus utiliza para unirse a la membrana de las células y la posible activación de una cascada de señalización que puede inducir estas primeras interacciones, lo cual es un proceso de gran interés para continuar con una caracterización. Es necesaria la elaboración de experimentos adicionales para determinar el papel de las interacciones descritas en este trabajo.

## 8. CONCLUSIONES

- 1) Se clonaron, expresaron y purificaron proteínas recombinantes GST-VP8\*core de 9 cepas diferentes de rotavirus de manera correcta y funcional.
- 2) Las proteínas GST-VP8\* de las cepas RRV, YM, Ch2-ibt, y B223 hemaglutinaron con los eritrocitos de tipo O, A y B.
- 3) Las cepas RRV, YM y Ch2-ibt reconocen al AS terminales debido a que las proteínas GST-VP8\*core disminuyeron su hemaglutinación al tratar los eritrocitos con NA y la proteína de la cepa B223 no reconoce al AS debido a que aumentó su hemaglutinación al tratar los eritrocitos con NA.
- 4) El aminoácido 187 de la proteína VP8\* de la cepa RRV está asociado con la especificidad, la afinidad y los efectos conformacionales en el sitio de unión.
- 5) La proteína GST-VP8\*core de las cepas RRV, YM, Ch2-ibt, B223, nar3, K8 y MDR-13 es suficiente para unirse a las células MA104.
- 6) La infectividad de las cepas MDR-13, K8 y Wa es aumentada con la preincubación de la proteína GST-VP8\*core de la cepa Ch2-ibt.
- 7) La cepa RRV reconoce al Neu5Ac, la cepa YM reconoce a un oligosacárido que contiene AS terminales en su cadena, las cepas UK y MDR-13 reconocen al trisacárido Gala1-3Galb1-4Glc (Isoglobotriosa) presente en el calostro y leche materna de diversas especies animales y no presente en humanos.

## 9. PERSPECTIVAS

- 1) Utilizar métodos Bioinformáticos para predecir la unión de la proteína GST-VP8\*core a los diferentes glicanos encontrados.
- 2) Realizar ensayos de Bloqueo de la Infectividad utilizando los glicanos sintéticos encontrados en este trabajo que se unen a las proteínas GST-VP8\*core.
- 3) Observar la unión de las proteínas recombinantes con otras líneas celulares
- 4) Analizar la interacción de la proteína GST-VP8\*core de cepas no descritas de rotavirus.
- 5) Determinar la constante de afinidad de unión de las proteínas GST-VP8\*core de rotavirus con los glicanos, utilizando Resonancia Magnética Nuclear.
- 6) Observar la unión de la proteína GST-VP8\*core con receptores de rotavirus de naturaleza proteica presentes en la membrana de células MA104.

## 10. REFERENCIAS

- Aoki S, Settembre EC, Trask SD, Greenberg HB, Harrison SC, Dormitzer PR.** (2009). Structure of rotavirus outer layer protein VP7 bound with a neutralizing Fab. *Science*. 324: 1444-1447.
- Bruns, M., Miska, S., Chassot, S., and Will, H.** (1998). Enhancement of hepatitis B virus infection by noninfectious subviral particles. *J. Virol.* 72, 1462–1468.
- Ciarlet, M., & Estes, M. K.** (1999). Human and most animal rotavirus strains do not require the presence of sialic acid on the cell surface for efficient infectivity. *The Journal of General Virology*, 80 (Pt 4), 943–8.
- Ciarlet, M., Ludert, J. E., Iturriza-gómara, M., Liprandi, F., Gray, J. J., Desselberger, U., & Estes, M. K.** (2002). Initial Interaction of Rotavirus Strains with N-Acetylneuraminic ( Sialic ) Acid Residues on the Cell Surface Correlates with VP4 Genotype , Not Species of Origin, 76(8), 4087–4095.
- Coulson BS, Londrigan SL, Lee DJ.** (1997). Rotavirus contains integrin ligand sequences and a disintegrin-like domain that are implicated in virus entry into cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 5389-5394.
- C. F. Arias; Isa, P; C. A. Guerrero; E. Mendez; S. Zárate; T. López; R. Espinosa; P. Romero; S. López.** (2002). *Molecular Biology of Rotavirus Cell Entry*. 4: 356-361
- Crawford SE, Mukherjee SK, Estes MK, Lawton JA, Shaw AL, Ramig RF, Prasad BV** (2001) Trypsin cleavage stabilizes the rotavirus VP4 spike. *J Virol* 75:6052–6061
- Delorme, C, Brüssow H., Sidoti J., Roche, N., Karlsson K., Neeser, J., and Teneberg, S ;** (2001) Glycosphingolipids binding specificities of rotavirus: identification of a sialic acid-binding epitope. *J Virol.* 75(5): p.2276-87.
- Denisova E., Dowling W., LaMonica R., Shaw R., Scarlata S., Ruggeri F. y Mackow E.R.** (1999). Rotavirus capsid protein VP5\* permeabilizes membranes. *J Virol.* 73: 3147-3153.
- Dormitzer P, R., Sun, Z. J., Blixt, O., Paulson, J.C., Wagner, G., and Harrison, S. C.** (2002). Specificity and Affinity of Sialic Acid Binding by the Rhesus Rotavirus VP8\* Core. *J Virol.* 76(20): p. 10512–10517
- Dormitzer PR, Sun ZY, Wagner G, Harrison SC.** (2002). The rhesus rotavirus VP4 sialic acid binding domain has a galectin fold with a novel carbohydrate binding site. *EMBO J.* 21:885–897.

- Estes, M. K. (2001)** Rotaviruses and their replication. En: Knipe, D. N. y Howley, P. M. (eds). *Virology*, 4th Ed., Lippincott Williams y Wilkins, Philadelphia, PA.
- Fiore L, Greenberg HB, Mackow ER.** (1991). The VP8 fragment of VP4 is the rhesus rotavirus hemagglutinin. *Virology* 181:553–563.
- Fukudome, K., Yoshie, O., & Konno, T.** (1989). Comparison of human, simian, and bovine rotaviruses for requirement of sialic acid in hemagglutination and cell adsorption. *Virology*, 172(1), 196–205.
- Guerrero, C. A., Zárate, S., Corkidi, G., Arias, C. F., Cells, M. A., Corkidi, G., & Lo, S.** (2000). Biochemical Characterization of Rotavirus Receptors in MA104 Cells, *J. Virol.* 74(20). 9362-9371
- Golantsova NE, Gorbunova EE, Mackow ER.** (2004). Discrete domains within the rotavirus VP5\* direct peripheral membrane association and membrane permeability. *L Virol* 78: 2037-2044.
- Graham, K. L., Halasz, P., Tan, Y., Hewish, M. J., Takada, Y., Mackow, E. R., Coulson, B. S.** (2003). Integrin-Using Rotaviruses Bind  $\alpha 2 \beta 1$  Integrin  $\alpha 2$  I Domain via VP4 DGE Sequence and Recognize  $\alpha X \beta 2$  and  $\alpha V \beta 3$  by Using VP7 during Cell Entry. *Journal of Virology*, 77(18), 9969–9978.
- Graham, K.L. et al.** (2003) Integrin-using rotaviruses bind  $\alpha 2 \beta 1$  integrin  $\alpha 2$  I domain via VP4 DGE sequence and recognize  $\alpha X \beta 2$  and  $\alpha V \beta 3$  by using VP7 during cell entry. *J. Virol.* 77, 9969–9978
- Guo, C.T; Nakagomi, O., Mochizuki, M., Ishida, M., Kiso, M., Ohta ., Suzuki,T., Miyamoto, D., I-P K., Hidari, J., and Suzuki, Y;** (1999) Ganglioside GM(1a) on the cell surface is involved in the infection by human rotavirus KUN and MO strain. *J Biochem.*, 126 (4): p.683-8.
- Haselhorst, T., Blanchard, H., Frank, M., Kraschnefski, M. J., Kiefel, M. J., Szyczew, A. J., von Itzstein, M.** (2007). STD NMR spectroscopy and molecular modeling investigation of the binding of N-acetylneuraminic acid derivatives to rhesus rotavirus VP8\* core. *Glycobiology*, 17(1), 68–81
- Haselhorst, T. et al.**(2009). Sialic acid dependence in rotavirus host cell invasion. *Nature Chem. Biol.* 5, 91–93
- Hoshino,Y., Sereno, M.M., Midthun, K., Flores, J., Chanock, R.M., Kapikian, A.Z.** (1987). Analysis by plaque reduction neutralization assay of intertypic rotaviruses suggests that gene reassortment occurs in vivo. *J. Clin. Microbiol.* 25, 290–294
- Hu, L., Crawford, S. E., Czako, R., Cortes-Penfield, N. W., Smith, D. F., Le Pendu, J., Estes, M. K., et al.** (2012). Cell attachment protein VP8\* of a human rotavirus specifically interacts with A-type histo-blood group antigen. *Nature*, 1-11.

- Huang, P., Xia, M., Tan, M., Zhong, W., Wei, C., Wang, L., Morrow, A., et al.** (2012). Spike protein VP8\* of human rotavirus recognizes HBGAs in a type-specific manner. *Journal of virology*.05507-11
- Isa, P: et al;** (1997). Functional and structural analysis of the sialic acid-binding domain of rotaviruses. *J Virol*, 71(9): p.6749-56
- Isa, P., Arias, C. F., & López, S.** (2006). Role of sialic acids in rotavirus infection. *Glycoconjugate journal*, 23(1-2), 27–37.
- Isa, P., M. Gutierrez, C.F. Arias, and S. López.**(2008).Rotavirus cell entry. *Future Virology.*, 3:135-146.
- Ishii, A.; Ikeda, T.; Hitoshi, S.; Fujimoto, I.; Torii, T.; Sakuma, K.; Nakakita, S.; Hase, S.; Ikenaka, K.** (2007) Developmental changes in the expression of glycoconjugates and the content of N-glycans in the mouse cerebral cortex. *Glycobiology* 17, 261-276
- James E.Gern ACP. Rhinoviruses.** In: **David M. Knipe PMH**, editor. *Fields Virology*. Sixth ed. Vol. 1. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins 2013, p. 531-5489
- Kapikian, A. Z., Hoshino, Y. and Chanock, R. M.** 2001. Rotaviruses. In D. M. Knipe. P. M. Howley (ed) *Fields Virology* 5<sup>th</sup> edition vol 2: Chapter 53. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
- Kelm S, Schauer R.** (1997). Sialic acids in molecular and cellular interactions. *Int. Rev. Cytol.*175:137–240.
- Kolter, T., Proia, R. L. & Sandhoff, K.** (2002) Combinatorial ganglioside biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 277, 25 859–25 862.
- Kuhlenschmidt TB, Hanafin WP, Gelberg HB, Kuhlenschmidt MS.** (1999). Sialic acid dependence and independence of group A rotaviruses. *Adv. Exp. Med. Biol.* 473:309–317.
- Larralde, G., Li, B., Kapikian, A.Z. and Gorziglia, M.** (1991). Serotype-specific epitope(s) present on the VP8 subunit of rotavirus VP4. *J. Virol* 66:7438-7443.
- Li Z, Baker ML, Jiang W, Estes MK, Prasad BV.** (2009). Rotavirus architecture at subnanometer resolution. *J. Virol.* 83:1754–1766.
- Liu, Y., Huang, P., Jiang, B., Tan, M., Morrow, A. L., & Jiang, X.** (2013). Poly-LacNAc as an age-specific ligand for rotavirus P[11] in neonates and infants. *PLoS One*, 8(11), e78113.

- Lopez, S., and C. F. Arias.** (2004). Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. *Trends Microbiol.*, 12:271-278.
- López S, Arias CF.** (2006). Early steps in rotavirus cell entry. *Current topics in microbiology and immunology.* 309: 39-66.
- Martinez, M. A.** (2012). Gangliosides have a functional role during rotavirus cell entry. *Journal of virology*, (November). /JVI.01964-12
- Matthijssens, J., Ciarlet, M., McDonald, S. M., Attoui, H., Bányai, K., Brister, J. R., Buesa, J., et al.** (2011). Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Archives of virology*, 156(8), 1397-413.
- Méndez E, Arias CF, López S** (1993) Binding to sialic acids is not an essential step for the entry of animal rotaviruses to epithelial cells in culture. *J Virol* 67:5253–5259
- Monnier, N. et al.** (2006). High-resolution molecular and antigen structure of the VP8\* core of a sialic acid-independent human rotavirus strain. *J. Virol.* 80, 1513–1523
- Olofsson S, Bergstrom T.** (2005). Glycoconjugate glycans as viral receptors. *Ann. Med.* 37:154–172.
- Otonel, R. A. A., Alfieri, A. F., & Alfieri, A. A.** (2014). Species H Rotavirus Detected in Piglets with Diarrhea, Brazil. (2012). *Emerg. Infect. Dis.* 20(6), 2012–2015.
- Patton, J. T.** (2012). Rotavirus Diversity and Evolution in the Post-Vaccine World. *Discov Med.* 13(68), 85–97.
- Parashar, U.D. et al.** (2003) Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg. Infect. Dis.* 9, 565–572
- Venkataram Prasad, B., Shanker, S., Hu, L., Choi, J.-M., Crawford, S. E., Ramani, S., Estes, M. K.** (2014). Structural basis of glycan interaction in gastroenteric viral pathogens. *Current Opinion in Virology*, 7C, 119–127.
- Proia, R.L;** (2003) Glycosphingolipid functions: insights from engineered mouse models. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 358 (1433): p. 553-72.
- Ramani, S., Cortes-Penfield, N. W., Hu, L., Crawford, S. E., Czako, R., Smith, D. F., Estes, M. K.** (2013). The VP8\* domain of neonatal rotavirus strain G10P[11] binds to type II precursor glycans. *Journal of Virology*, 87(13), 7255–64.

- Rolsma, M., Kuhlenschmidt, T., Gelberg, H. and Kuhlenschmidt, M.** (1998). Structure and function of a ganglioside receptor for porcine rotavirus. *J Virol* **72**, 9079-91.
- Sandhoff, K. & Kolter, T.** (2003) Biosynthesis and degradation of mammalian glycosphingolipids. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **358**, 847–861.
- Santos N, Hoshino Y.** (2005) Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev Med Virol* **15** (1):29-56
- Settembre EC, Chen JZ, Dormitzer PR, Grigorieff N, Harrison SC.**(2011). Atomic model of an infectious rotavirus particle. *EMBO J.* **30**:408–416.
- Strong, J. E., Coffey, M. C., Tang, D., Sabinin, P., and Lee, P. W. K.** (1998). The molecular basis of viral oncolysis: Usurpation of the Ras signaling pathway by reovirus. *EMBO J.* **17**, 3351–3362.
- Trask, S. D., McDonald, S. M., & Patton, J. T.** (2012). Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication. *Nature Reviews. Microbiology*, **10**(3), 165–77.
- Yu, R. K., Ariga, T., Yanagisawa, M.; Zeng, G.** (2008). Gangliosides in the nervous system: Biosynthesis and degradation in *Glycoscience* (Fraser-Reid, B., Tasuka, K., Thiem, J. ed.) Springer-Verlag. Berlin-Heidelberg, Germany. pp.1671-1695
- Yu, X; Coulson, B., Fleming, F., Dyason, J., Itzstein, M. and Blanchard ,H.**(2011) Novel Structural Insights into Rotavirus Recognition of Ganglioside Glycan Receptors. *J.Mol.Biol* **413**. 929-939
- Yu, X; Vi T. Dang, Fiona E. Fleming, Mark von Itzstein, B. S. C., & Blanchard., and H.** (2012). Structural Basis of Rotavirus Strain Preference toward N-Acetyl- or N-Glycolylneuraminic Acid-Containing Receptors. *Journal of virology*, **86**(24), 13456–66.
- Yu R. K., Yi- Tsai, T; Ariga T. and Yanagisawa M** (2011). Structures, Biosynthesis, and Functions of Gangliosides-an Overview. *J. Oleo Sci.*, **60**(10): p.537-544.
- Zarate, S. et al. (2000)** Integrin alpha2beta1 mediates the cell attachment of the rotavirus neuraminidase resistant variant nar3. *Virology* **278**, 50–54
- Zarate, S. et al. (2003)** Interaction of rotaviruses with Hsc70 during cell entry is mediated by VP5. *J. Virol.* **77**, 7254–7260