

INDICE

	página
INTRODUCCION	1
OBJETIVO	15
MATERIALES Y METODOS	16
RESULTADOS	28
- Construcción de un plásmido para la expresión del gene 4(5') del rotavirus SA11	28
- Expresión del gene 4(5') del rotavirus SA11	36
- Identificación inmunológica del poli- péptido MS2-VP8'	38
- Enriquecimiento la la proteína híbrida	40
DISCUSION	42
ANEXOS	46
REFERENCIAS	48



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está 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.

" Existe el consenso general de que la salud es producto y a la vez determinante de un proceso global de desarrollo cuyo fin es el bienestar común. Se reconoce cada vez más la estrecha relación que los indicadores de salud tradicionales guardan con los factores del contexto socioeconómico..." (1)

INTRODUCCION

Estudios realizados en países subdesarrollados de Asia, Africa y América Latina muestran que los fenómenos biológicos responsables de la mortalidad infantil están relacionados con el deterioro de las condiciones ambientales, de vivienda, de alimentación y de educación; factores que caracterizan el estilo y la calidad de vida de estas sociedades (1).

Entre 1976 y 1979 las enfermedades del aparato respiratorio y las del aparato digestivo fueron las que provocaron el mayor número de bajas en la población infantil latinoamericana menor de 4 años (ver anexo I).

En países del tercer mundo, la diarrea aparece como la causa más importante de mortalidad infantil. Tan sólo en 1982, se reportan 4.6 millones de muertes, por ese motivo, de infantes menores de 4 años (2).

Todavía hasta hace dos décadas imperaba, particularmente entre los nutricionistas, la idea de que gran parte de los casos que se presentaban de diarrea eran imputables a la mala alimentación. Esta posición se robustecía por la asociación entre la diarrea y la desnutrición -común en países en vías de desarrollo- y por la incapacidad de demostrar en el laboratorio la etiología infecciosa de la mayoría de los casos. En el momento actual no queda ninguna duda de que la mayoría de las diarreas que se observan en la población infantil, tienen un origen infeccioso.

Dentro de las enfermedades dirréricas, la gastroenteritis viral aguda es

muy común entre los niños. Aunque este padecimiento es aparentemente producido por distintos tipos de virus, hoy se reconoce al rotavirus como uno de sus agentes etiológicos más importantes (3).

En México, el rotavirus es el responsable de aproximadamente el 25% de los casos de diarrea en niños menores de 3 años que, por el alto grado de deshidratación que llegan a alcanzar, requieren de hospitalización (4).

En la Cd. de México, la mayor incidencia de gastroenteritis causada por rotavirus aparece durante el otoño, en especial en niños desde 6 meses hasta 3 años (5). Este virus es altamente contagioso por vía orofecal y tiene un período máximo de incubación de 48 horas. El cuadro clínico presente durante la infección se caracteriza por diarrea severa (que suele durar hasta cinco días), fiebre, vómito, deshidratación y deterioro del estado nutricional, pudiendo llegar a ser letal aún en lugares con buena atención médica (6).

Los rotavirus también han sido detectados en otras especies de mamíferos jóvenes y en aves (7,8). En algunos animales de crianza, las diarreas causadas por este agente producen grandes pérdidas económicas, tanto por retardo en la ganancia de peso como por muerte (9).

En este marco, los servicios de salud encaminan sus esfuerzos a mejorar las condiciones sanitarias generales, la higiene y la educación en los grupos de mayor riesgo; mientras que la investigación biomédica trabaja en la elaboración de una vacuna contra rotavirus, con el afán de disminuir la morbilidad y la mortalidad por esta causa (10).

Los primeros reportes de este agente viral corresponden a los estudios de microscopía electrónica realizados por Adams y Kraft en 1958 (11), quienes establecieron que el agente causal de la diarrea no bacteriana que presentaban ratones jóvenes, era un virus que se multiplicaba en las células epiteliales del intestino delgado. Lo llamaron virus EDIM (Epizootic Diarrhea of Infant Mice). En 1963, Malherbe y otros (12) describieron el aislamiento, a partir del exudado rectal de un mono sano, de un virus de 70 nm de diámetro, al que denominaron SA11 (Simian Agent). En 1971, Mebus reportó el exitoso cultivo en líneas primarias de células de feto de bovino, de un virus que provocaba diarrea en el ternero de Nebraska (NCDV) (13).

No fue sino hasta 1973 que R. Bishop descubrió a los rotavirus que infectan al hombre. Al examinar biopsias duodenales de niños que presentaban gastroenteritis aguda no-bacteriana, el microscopio electrónico le permitió observar estas partículas virales, hasta entonces desconocidas en humanos (14). En la actualidad, el conocimiento de la biología de los rotavirus como de la epidemiología de la diarrea que causan, ha aumentado considerablemente (15).

Los estudios realizados por Bishop sobre la patogénesis de la infección causada por rotavirus en humanos (15) y los estudios hechos en animales de experimentación (16), han mostrado que estas partículas proliferan en las células epiteliales de la punta de las vellosidades del intestino delgado, causando vacuolización y su desprendimiento prematuro. Varios trabajos de microscopía electrónica e inmunofluorescencia sugieren que sólo las células epiteliales diferenciadas son susceptibles al ataque de los rotavirus, ya que las partículas o los antígenos virales sólo se pueden localizar en el extremo superior de la vellosidad y no en las células inmaduras generadas en las criptas (17).

Posteriormente, debido a la acelerada pérdida de células infectadas en las puntas, las vellosidades se recubren de células inmaduras (provenientes de las criptas), incapaces de desarrollar normalmente las funciones de adsorción. Aparentemente, estas células son resistentes a este tipo de infección debido a que, probablemente, carecen de receptores del virus en cuestión; éste podría ser un mecanismo para limitar el tiempo de la infección (18).

Actualmente, se han logrado crecer en células de riñón de mono, rotavirus aislados de humanos (Wa, ST3 y DS1, por ejemplo) y de algunos animales: ternera (NCDU y UK), simio (SA11) y cerdo (YM y OSU); con lo que se dispone de sistemas modelo para el estudio de la enfermedad. Sin embargo, ante la imposibilidad inicial de crecer in vitro los rotavirus de humano, el primero que logró implementarse fue el cultivo de rotavirus de simio SA11. Es por ello que gran parte de la información está basada en este modelo.

Mediante microscopía electrónica se observa que el diámetro de las partículas virales completas (de SA11) oscila entre 70 y 75 nm (19). Están constituidos por un genoma viral de RNA de doble cadena, envuelto por una doble cápside protéica (20). Los rotavirus han adoptado su nombre de la voz latina rota (rueda) debido a que puede verse que las subunidades de la capa interna semejan a filamentos que sostienen un delgado aro que constituye la capa externa, como una rueda radiada (ver fig. 1). Por su forma y su composición, estos virus han sido clasificados como un género independiente dentro de la familia Reoviridae (21).

Los rotavirus se componen de, cuando menos, cinco proteínas estructurales: tres de capa interna, VP1, VP2 y VP6; y dos de capa externa, VP3 y VP7 (22).

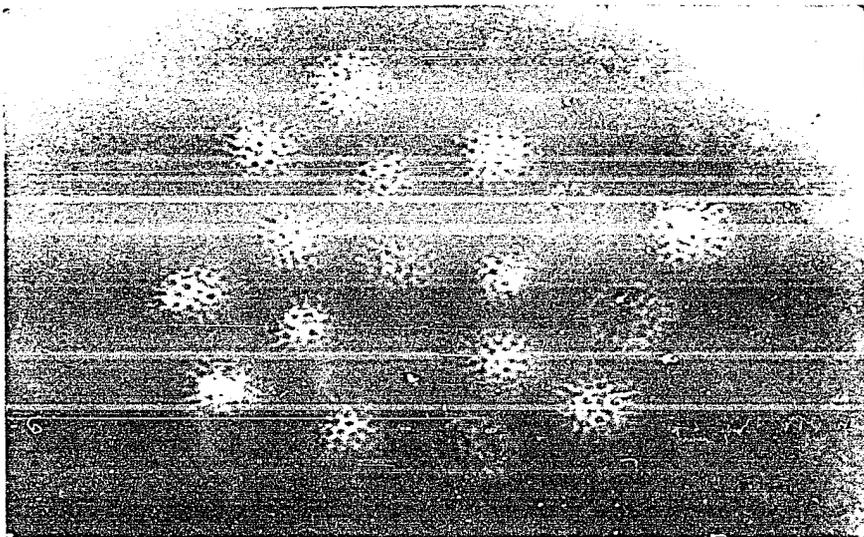


Figura 1.-

Rotavirus provenientes de heces de un niño con gastroenteritis.

Existen también, partículas incompletas que carecen de la cápside externa y miden ~55 nm de diámetro.

La capacidad infectiva del virión es conferida por la presencia de la capa externa, importante en la adsorción y penetración del virus a la célula huésped; la remoción de dicha capa mediante agentes quelantes de metales bivalentes como EDTA o EGTA, conlleva a la pérdida de la infectividad del virus. Estos agentes quelantes convierten a las partículas de doble capa (con densidad de 1.36 g/cm^3 en CsCl) en partículas de capa sencilla (1.38 g/cm^3 en CsCl). Sin embargo, una vez dentro de la célula huésped, la remoción de la capa externa es necesaria para la posterior activación de la polimerasa de RNA viral, indispensable para la transcripción del genoma del virus (23).

El genoma viral se encuentra dividido en 11 segmentos -que contienen desde 660 a 4,000 pares de bases- de RNA de doble cadena. Estos pueden separarse mediante electroforesis, lo que ha permitido encontrar diferencias en la migración de los segmentos de RNA entre distintas especies de rotavirus (24,25) (ver fig. 2).

Los rotavirus analizados hasta la fecha, independientemente de la especie animal de procedencia, comparten cuando menos un determinante antigenico. Experimentos con anticuerpos monoclonales han permitido identificar a VP6 (el polipéptido más abundante de la capa interna) como el portador de los determinantes antigenicos comunes (26,27). No obstante, el análisis serológico de re-arreglantes virales (que se obtienen al coinfectar células con dos distintas cepas de rotavirus) muestra la presencia en VP6, de cuando menos un determinante antigenico no común. Esto ha servido para clasificar a los rotavirus en 2 subgrupos (I y II) bien definidos (28,29).

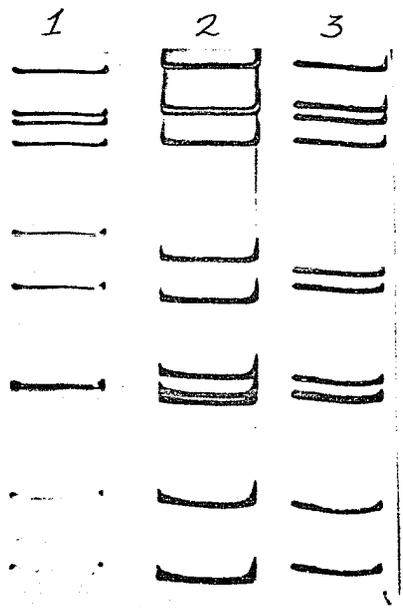


Figura 2.-

Patrones electroforéticos de RNA de distintas cepas de rotavirus: 1) de simio SA11; 2) de cerdo YM; 3) de humano.

En las proteínas de capa externa, VP3 y VP7, se encuentran los determinantes antigénicos que inducen en el huésped la producción de anticuerpos neutralizantes, capaces de inhibir la infección viral. Esto se ha determinado mediante pruebas de neutralización -utilizando anticuerpos policlonales (30) y monoclonales (31) que reconocen ambas proteínas- y análisis genéticos e inmunológicos de rearrreglantes virales (32,33). A través de ensayos de neutralización cruzada se han podido clasificar cuatro diferentes clases de rotavirus de humano, denominadas "serotipos" (34). Esta técnica permite observar que el rotavirus de simio SA11 es similar, si no es que idéntico, al rotavirus de humano perteneciente al serotipo 3 (35).

Otras funciones particulares de las proteínas virales han sido reconocidas mediante el uso de anticuerpos monoclonales (36,37) y el análisis de los fenotipos de distintos rotavirus rearrreglantes (38,39). Asimismo, la traducción in vitro de los segmentos separados de RNA viral, ha permitido determinar cuál es la proteína codificada por cada uno de los genes (40,41). Los estudios a este respecto fueron recopilados por Cukor y Blacklow. (ver anexo II)

En la capa externa la proteína más abundante es VP7, de 37,000 daltones. Está glicosilada con oligosacáridos de "alta manosa" (40) y ha sido relacionada con la adsorción del virus a la célula huésped (42). Su precursor no glicosilado, está identificado como el producto de la traducción del segmento 9 del genoma de las cepas de rotavirus de simio SA11; de humano, Wa y Hu5; de bovino, NCDV; y del segmento 8 de la cepa de rotavirus bovino, UK. Actualmente, estos genes se han clonado y secuenciado, lo que ha dado la oportunidad de comparar secuencias nucleotídicas y de aminoácidos de genes que corresponden a virus con diferente serotipo y especificidad (43,44,45).

La otra proteina de capa externa es VP3, de 88,000 daltones. Se ha identificado como el producto de la traducción del gene 4 (41), del cual se conoce aproximadamente el 80% de su secuencia, gracias a la clonación del genoma del rotavirus de simio SA11 (46).

En los rotavirus, el gene 4 es el responsable de codificar por la función que limita el crecimiento in vitro de ciertos rotavirus "no cultivables". Esto se dedujo al ver que después de coinfectar células en cultivo, con un rotavirus humano no cultivable y uno de bovino adaptado al cultivo de células, se obtenían rearreglantes cultivables del serotipo de humano, donde siempre aparecía el segmento 4 del genoma del rotavirus de bovino (38).

La propagación eficiente de los rotavirus en cultivo de células, requiere de un tratamiento con tripsina de las partículas virales; esto puede aumentar su infectividad hasta en 1,000 veces (47). Se ha demostrado que el efecto de esta proteasa recae directamente sobre el virus y no sobre la célula (48). El resultado principal de esta acción es el rompimiento específico de VP3 en dos proteínas menores: VP5 (de 60,000 daltones) y VP8 (de 28,000 daltones) (22). Este proceso no afecta significativamente al resto del virión (ver fig. 3).

Es probable que el mencionado tratamiento active un paso temprano en la replicación viral. Esto se piensa debido a que un incremento semejante, consecuencia del rompimiento proteolítico específico de una proteína viral, se opera en otras familias de virus como los Paramixovirus (virus del sarampión, parotiditis, etc.) y los Mixovirus (virus de la influenza). El análisis de los productos resultantes de dicho corte, ha mostrado que la secuencia de aminoácidos del extremo amino terminal recién generado, se asemeja en las dos fami-

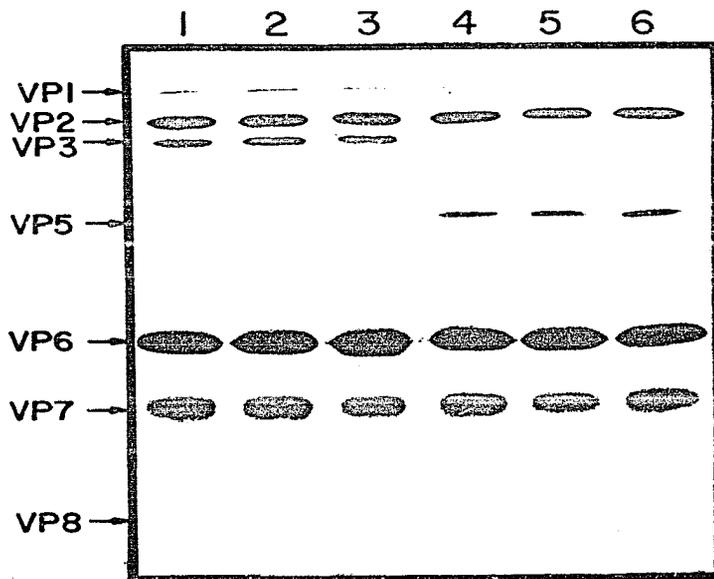


Figura 3.-

Proteínas de SA11 (en un gel de acrilamida-SDS), marcadas con ³⁵S e incubadas con diferentes concentraciones de tripsina: 1) sin tripsina; 2) 1 µg/ml; 3) 2 µg/ml; 4) 5 µg/ml; 5) 10 µg/ml; y 6) 100 µg/ml.

11.

lias de virus. La proteína (F en Paramixovirus y HA en Mixovirus) que sufre este rompimiento es la responsable de la fusión de la membrana viral y celular durante la infección (49). Esto sugería la necesidad de una secuencia específica en el extremo amino terminal recién generado, para que la proteína tuviera dicha actividad biológica. Gracias a la mimesis de la secuencia del extremo amino antes mencionado y a través de la síntesis química de péptidos, se observó que dichos péptidos eran capaces de inhibir la fusión de las membranas viral y celular, atenuando la infectividad del virus en cultivo celular (50).

El incremento de la infectividad mediado por tripsina, se ha observado en un gran número de rotavirus de diferentes especies. En SA11 se ha visto que la secuencia de aminoácidos de la región amino terminal del sitio de corte de VP3, muestra dos sitios -separados por sólo seis aminoácidos- que pueden ser los involucrados en el efecto de la tripsina sobre el virus (46). No se sabe si es uno o ambos sitios los que intervienen en el rompimiento asociado con el aumento de la infectividad. Cabe añadir que esta región de corte se mantiene en los rotavirus que pertenecen a distintos serotipos (51).

Aunado a su papel en el aumento de la infectividad, VP3 es responsable de la actividad hemaglutinante en ciertos rotavirus animales (52). Durante el análisis de virus rearreglantes obtenidos de células coinfectadas con rotavirus rhesus (hemaglutinante) y rotavirus UK de bovino (no hemaglutinante), se observó que los anticuerpos monoclonales, con actividad inhibitoria de la hemaglutinación, sólo reaccionaban con los rearreglantes cuyo gene 4 se derivara del rotavirus rhesus original (31). Algunos de estos monoclonales también neutralizaron al rotavirus rhesus, en un título moderado, por lo que se le atribuyó a VP3, un papel menos importante en la neutralización que a VP7.

Recientemente se han obtenido anticuerpos dirigidos contra VP3 de los rotavirus SA11 y NCDV, que neutralizan la infectividad viral en forma equiparable a aquéllos dirigidos contra VP7 (53). Estos anticuerpos reaccionaron con VP8, el producto menor del rompimiento de VP3; uno de ellos neutralizó a las dos cepas de rotavirus y cuando se incubó con los virus antes de que fueran tratados con tripsina, evitó el rompimiento de VP3. Esto sugiere que el sitio de rompimiento o un sitio cercano a éste, puede ser capaz de inducir anticuerpos que neutralicen cruzadamente.

Otros estudios (54,55) describen el aislamiento de anticuerpos monoclonales dirigidos contra VP3, que neutralizan a algunas cepas de rotavirus que pertenecen a distintos serotipos. En uno de los estudios (54), se demostró la capacidad de estos anticuerpos para proteger pasivamente a ratones lactantes que fueron retados con tres diferentes serotipos.

Uno de los objetivos en la investigación de la gastroenteritis viral es el desarrollo de una vacuna efectiva, basado en el conocimiento de la naturaleza antigénica del rotavirus. Hasta ahora, los métodos tradicionales utilizados en la obtención de un inmunógeno, no han arrojado resultados alentadores. Por ejemplo, cuando se utilizó una cepa atenuada de NCDV (bovino) no fue posible generar una respuesta inmune protectora en bovinos (56). También se han hecho estudios en cerdos, para evaluar la capacidad protectora de rotavirus de bovino, contra infecciones provocadas por rotavirus de humano; sin embargo, los resultados tampoco han sido conclusivos (57).

Cabe añadir que la utilización de patógenos completos en la elaboración de

vacuna no representa el sistema ideal, debido a una posible reactivación de la virulencia, en el caso de las cepas atenuadas; como a una deficiente inactivación, si se trata de virus inactivados (58). Aunado a esto, en los países subdesarrollados, la falta de equipo adecuado dificulta el mantenimiento de una cadena fría, tan necesaria para mantener la integridad de las partículas virales.

Una alternativa para evitar el empleo del microorganismo completo es la utilización, como inmunógenos, de la(s) proteína(s) o las regiones de ésta(s), que estén involucradas en la inducción de anticuerpos neutralizantes. Es conveniente pues, identificar y caracterizar a las proteínas virales participantes en la inducción de inmunidad.

La identificación de las regiones antigénicas de algunos virus, se ha realizado a través de la utilización de anticuerpos monoclonales (59) y del análisis de los perfiles de hidrofiliidad de los polipéptidos de interés (60). Al contar con esta información, se ha considerado la posibilidad de sintetizar, química o biológicamente, dichas regiones para probar su capacidad inmunogénica.

Un camino para la síntesis de proteínas es la expresión de éstas a partir de genes específicos. La aplicación de la tecnología de DNA recombinante, ha permitido que los genes portadores del código de un producto determinado puedan ser aislados, seleccionados en clonas individuales y propagados mediante la inserción del material genético (natural o sintético) en un vector adecuado.

Hoy en día existen técnicas de expresión controlada de genes insertos en

Vectores de procariotas o eucariotas. Con estas técnicas y a través de sistemas celulares adecuados, es factible la producción de proteínas que contengan, por ejemplo, epitopes de neutralización pertenecientes a microorganismos que son de interés para la inducción de una respuesta inmune protectora.

Dos de los métodos utilizados en la producción de la proteína de interés son:

- 1) La proteína se sintetiza en células procariotas o eucariotas, transformadas con vectores que llevan inserto al gene respectivo. Esto se ha realizado, exitosamente, con varios antígenos virales como la hemaglutinina de influenza A (61), el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (62), la glicoproteína D del virus herpes simple tipo 1 (63) y el polipéptido VP3 del virus de la fiebre aftosa (64). En todos estos casos, el producto sintetizado ha sido capaz de inducir anticuerpos que neutralizan la infección viral in vitro; y en el caso del virus de la fiebre aftosa, logra inducir protección in vivo.
- 2) La proteína se sintetiza en las células que son infectadas con virus recombinantes infecciosos, portadores de secuencias de DNA que codifican para el producto deseado. De esta forma se han logrado construir, por ejemplo, virus recombinantes de vaccinia, que expresan genes que determinan antígenos de superficie de hepatitis B (65), de herpes (66), de rabia (67), etc. Las células infectadas con estos virus, sintetizan el antígeno respectivo. Asimismo, se han construido recombinantes del virus herpes simple, con el objeto de obtener, en células infectadas, al antígeno de superficie de la hepatitis B (68).

Objetivo.-

En base a los resultados positivos alcanzados en la síntesis de proteínas de origen eucariote en cepas de E. coli (61-64), este trabajo pretende diseñar y desarrollar una estrategia que permita la síntesis de una región de VP3 que contenga, primordialmente, a VP8 y al sitio de corte con tripsina. La importancia de esta región radica en que el sitio de corte, o una región cercana, ha sido sugerido como el responsable de la inducción de anticuerpos neutralizantes (53).

MATERIALES Y METODOS

CEPAS BACTERIANAS

Se utilizaron dos cepas de *Escherichia coli* K-12 como células receptoras para los experimentos de transformación:

RR1 (λ) [F⁺ hsdS20(r_a⁻, m₈⁻), ara-14, proA2, lacY1, galK12, rpsL20(Sm^r), xyl-5, mtl-1, supE44, λ]. Esta cepa sintetiza, a partir de un gene cromosomal qI, al represor para el promotor P_L de lambda; de este modo, mantiene reprimida la transcripción de dicho promotor.

La otra, MS219 (cepa M72 lac Zam trpam Sm^r - λ bio 252qI857AH1-) contiene integrado, en el genoma celular, un profago defectivo de lambda (69). Dicho profago porta al gene mutante qI857, mismo que determina a un represor termosensitivo del promotor P_L del fago lambda.

PLASMIDOS

Se utilizó el plásmido pSR4-2, derivado del pMT21, obtenido del banco de genes resultante de la clonación del genoma del rotavirus de simio SA11 (43, 46). Este plásmido contiene inserto, aproximadamente, el 45% del gene 4 del rotavirus de simio SA11, incluida la región del gene que codifica para el sitio susceptible a ser cortado con tripsina en VP3 (46) (fig. 4A).

En los estudios de expresión se utilizó el vector pPLc24 (69). Este vector cuenta con el promotor P_L del bacteriófago lambda y con la región del gene

de la polimerasa del bacteriófago MS2 que codifica por los primeros 98 aminoácidos de la misma. Este plásmido contiene además, el gene de resistencia a ampicilina.

MEDIOS DE CULTIVO

Caldo de Luria (LB):

- peptona de caseína (Bioxon) al 1%
- extracto de levadura (Difco) al 0.5%
- NaCl al 0.5%
- 3mM de NaOH

La siembra de bacterias transformantes y el aislamiento de cepas, se practicaron en caldo de Luria, suplementado con bactoagar (Difco) al 2% y ampicilina en una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ cuando fue requerida.

Medio máximo de inducción (MX):

- peptona de caseína al 3.2%
- extracto de levadura al 2%
- 0.1 mM MgSO_4
- sales M9 1x (6 g de Na_2HPO_4 , 3 g de KH_2PO_4 , 0.5 g de NaCl y 1 g de NH_4Cl ; en un litro de H_2O)

PURIFICACION DEL DNA DE PLASMIDO

El método que se siguió para purificar el DNA de los plásmidos pSR4-2 y pPlc24, es el siguiente:

1. Inocular de 5 a 10 ml de LB (adicionada con 25 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina) con la cepa de Escherichia coli portadora del plásmido deseado.
2. Agregar 5 ml del cultivo obtenido, a 500 ml de Luria con ampicilina (25 $\mu\text{g/ml}$).
3. Incubar el medio a 37°C con aereación hasta que la densidad óptica del cultivo, a 550 nm, llegue a 1. En este momento se debe añadir 170 $\mu\text{g/ml}$ de cloramfenicol, continuando la aereación por, aproximadamente, 12 hr. Esto aumentará el crecimiento del plásmido en el cultivo.
4. Centrifugar en el rotor GSA (Sorvall) a 7,000 rpm y a 4°C, durante 10 min.
5. Lavar las células centrifugadas con $\frac{1}{2}$ del volumen inicial de una solución amortiguadora de 10mM Tris pH 8.5, 1mM EDTA. Centrifugar nuevamente (según inciso 4).
6. Resuspender la pastilla de células en 3 ml por cada 50 a 100 ml de medio de cultivo, de solución de sacarosa al 10% en 50mM Tris pH 7.5, 80mM EDTA.
7. Con el fin de lisar la pared celular, agregar por cada 50 a 100 ml del cultivo inicial, 400 μl de lisozima (10mg/ml en amortiguador de sacarosa).
8. Mezclar suavemente y dejar 10 min incubando a temperatura ambiente.
9. Congelar (a -70°C) las células y descongelarlas a 37°C. Repetir el proceso una vez más.
10. Centrifugar en el rotor SW40 (ultracentrifuga Beckman) a 30,000 rpm y a 4°C, durante 30 min.
11. Decantar el sobrenadante en tubos de policarbonato de 50 ml y, posteriormente, añadir $\frac{1}{2}$ volumen de LiCl al 20% y un volumen de isopropanol frío.
12. Congelar a -70°C y descongelar a temperatura ambiente.
13. Centrifugar a 10,000 rpm y a 4°C, durante 20 min en el rotor SS34 (Sorvall).
14. Lavar la pastilla con etanol frío al 70%; secar el precipitado con aire y

- resuspenderlo en 4 ml de amortiguador TE (10mM Tris pH 7.5, 1mM EDTA) por cada 50 a 100 ml de medio original.
15. Agregar 3.7 g de CsCl y 0.8 ml de una solución de EtBr (100 mg/ml en H₂O) por cada 4 ml del resuspendido del paso 14.
 16. Centrifugar a 12,000 rpm, durante 20 min en el rotor SS34 (Sorvall).
 17. Rescatar el sobrenadante con una pipeta Pasteur, evitando la película que flota en la superficie, formada por agregados de proteínas y EtBr.
 18. Transferir las muestras a tubos afines al rotor Beckman SW55.
 19. Centrifugar a 35,000 rpm y a temperatura ambiente, de 48 a 60 hr. Durante este tiempo se formará un gradiente en el que las moléculas habrán migrado de acuerdo a su densidad.
 20. Iluminar, en la oscuridad, los tubos con luz UV. Con esto se observarán dos bandas: la superior, formada por el DNA bacteriano roto y el DNA relajado; y la inferior, formada por el plásmido superenrollado.
 21. Recuperar la banda inferior.
 22. Para eliminar el EtBr, añadir un volumen de isobutanol saturado con amortiguador 10mM Tris pH 7.5, 1mM EDTA y 5M NaCl. Mezclar y dejar que las fases se separen.
 23. Eliminar la fase superior y repetir el proceso hasta que el color rosa desaparezca de las muestras.
 24. Pasar lo obtenido a un tubo de vidrio y agregar dos volúmenes de H₂O. Añadir a la mezcla 1/10 de volumen de 2M NaAc y 6 volúmenes de etanol. Dejar la solución a -20°C, durante toda una noche.
 25. Centrifugar en el rotor SS34 a 10,000 rpm, durante 20 min.
 26. Lavar el precipitado con etanol frío al 70% y resuspender en 1/20 del volumen del sobrenadante, de 10mM Tris pH 7.5, 1mM EDTA. El DNA obtenido de este modo, puede almacenarse a -20°C.
 27. Para determinar la concentración del DNA, medir la densidad óptica

(a 260 nm) de las muestras.

ENZIMAS

Para la construcción del vector de expresión se utilizaron las siguientes enzimas:

a) ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN HhaI, HindIII, BamHI y EcoRI. (New England Biolabs).

Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo a 37°C en presencia de 4mM de espermidina y amortiguador MS o HS según el caso (50 ó 100mM NaCl respectivamente, con 10mM Tris pH 7.5, 10mM MgCl₂, 1mM ditiotreitól).

b) KLENOW ó FRAGMENTO GRANDE DE POLIMERASA I DE DNA DE E.COLI. (New England Biolabs).

Esta enzima se utilizó en las siguientes condiciones: amortiguador MS, 5µCi de dATP, 50µM de dNTPs; incubando durante 30 min a temperatura ambiente y, posteriormente, 10 min a 70°C para inactivar a la enzima.

c) FOSFATASA ALCALINA BACTERIANA. (Amersham)

Condiciones de reacción: en 10mM Tris pH 8.3 a 65°C, durante 30 min.

d) LIGASA DE DNA DEL FAGO I4. (Amersham)

Condiciones de reacción: en amortiguador de ligasa 1x (0.05M Tris pH 7.4, 0.01M ditiotreitól, 1mM espermidina, 1mM ATP, 0.1 mg/ml albúmina de suero bovino), a 15°C, durante 12 hr. La reacción se llevó a cabo con un exceso 2 molar del inserto sobre el vector.

Quando se requirió en cada una de las reacciones anteriores, las muestras fueron extraídas dos veces con un volumen igual de fenol saturado y dos veces

con un volumen de cloroformo. Al DNA en la fase acuosa, se le agregó 2.5 volúmenes de etanol y 0.1 volumen de 2M NaAc. Después, de congelar a -70°C por 15 min, el agregado se centrifugó durante 10 min a $12,000 \times g$.

ELECTROFORESIS PREPARATIVA EN GELES DE AGAROSA

Para separar preparativamente los fragmentos de DNA, se hicieron geles horizontales de agarosa de bajo punto de fusión (Seakem) en amortiguador E (0.4 g de NaAc, 4.8 g Tris base, 1.83 ml de ácido acético glacial; en un litro de H_2O).

La electroforesis se realizó a 100 Volts y los geles se tiñeron con BrEt (1mg/l en H_2O). Con una lámpara de luz UV de onda larga se localizó el fragmento deseado, mismo que posteriormente fue cortado con bisturí. Una vez fundida la agarosa a 65°C , se extrajo el DNA con fenol, isobutanol y cloroformo. Luego se precipitó con etanol y NaAc de la misma manera que se describió anteriormente.

TRANSFORMACION DE ESCHERICHIA COLI K-12

Las cepas de E. coli RR1 y M5219, se hicieron competentes para la transformación de acuerdo al método siguiente:

1. Inocular 50 ml de LB con 1/100 de un cultivo de la cepa (RR1 o M5219) crecido toda la noche. Dejar que el cultivo alcance una densidad óptica de 0.5, a 500 nm.
2. Colocar el cultivo en un tubo estéril, incubarlo 15 min en hielo. Poste-

con un volumen de cloroformo. Al DNA en la fase acuosa, se le agregó 2.5 volúmenes de etanol y 0.1 volumen de 2M NaAc. Después, de congelar a -70°C por 15 min, el agregado se centrifugó durante 10 min a $12,000 \times g$.

ELECTROFORESIS PREPARATIVA EN GELES DE AGAROSA

Para separar preparativamente los fragmentos de DNA, se hicieron geles horizontales de agarosa de bajo punto de fusión (Seakem) en amortiguador E (0.4 g de NaAc, 4.8 g Tris base, 1.83 ml de ácido acético glacial; en un litro de H_2O).

La electroforesis se realizó a 100 Volts y los geles se tiñeron con BrEt (1mg/l en H_2O). Con una lámpara de luz UV de onda larga se localizó el fragmento deseado, mismo que posteriormente fue cortado con bisturí. Una vez fundida la agarosa a 65°C , se extrajo el DNA con fenol, isobutanol y cloroformo. Luego se precipitó con etanol y NaAc de la misma manera que se describió anteriormente.

TRANSFORMACION DE ESCHERICHIA COLI K-12

Las cepas de E. coli RR1 y M5219, se hicieron competentes para la transformación de acuerdo al método siguiente:

1. Inocular 50 ml de LB con 1/100 de un cultivo de la cepa (RR1 o M5219) crecido toda la noche. Dejar que el cultivo alcance una densidad óptica de 0.5, a 500 nm.
2. Colocar el cultivo en un tubo estéril, incubarlo 15 min en hielo. Poste-

- riormente, centrifugar en el rotor SS34, a 6,000 rpm y a 4°C durante 10 min
3. Decantar y resuspender las células en 25 ml de 50mM de CaCl₂ , 10mM Tris pH 7.5, dejándolas 20 min en hielo, y nuevamente centrifugar (según paso 2).
 4. Decantar y resuspender en 3.3 ml de 50mM CaCl₂ , 10mM Tris pH 7.5, incubar en hielo de 1 a 5 hr.
 5. Colocar 0.2 ml de esta suspensión en un tubo de 1 ml y añadir 1 ng del plásmido superhelicoidal o 100 ng del relajado. Dejar los tubos en hielo durante 30 min.
 6. Incubar las células con el DNA a 42°C, durante 2 min.
 7. Agregar 1 ml de LB a cada tubo e incubarlos durante 1 hr a 37°C, para luego centrifugar.
 8. Resuspender en LB y platear en medio sólido de LB con ampicilina (100µg/ml).
 9. Incubar durante toda la noche, a 30°C si se trata de la cepa MS219 y a 37°C si es la RR1.

HIBRIDIZACION EN COLONIA

Este procedimiento se siguió para detectar secuencias específicas de DNA, y consistió en:

1. Crecer las colonias transformantes sobre filtros de nitrocelulosa (Schleicher y Schuell) en LB sólido, con ampicilina (100 µg/ml).
2. Para lisar las colonias, colccar los filtros mencionados: a) una vez durante 5 min, en un papel filtro humedecido con 0.5M NaOH, 1.5M NaCl; y b) dos veces, 5 min cada una, sobre papel humedecido con 0.5M Tris pH 7, 1.5M NaCl.
3. Dejar secar al aire y hornear al vacio y a 80°C, durante 2 hr.
4. Colocar los filtros de nitrocelulosa en bolsas de plástico y prehibridizar a

- 42°C durante 3 hr o más, con 5x SSPE (0.9M NaCl, 50mM NaH₂PO₄, 5mM EDTA pH 7) en 50% de formamida desionizada, 1x solución Denhardt (0.1% Ficoll, 0.1% polivinilpirrolidona, 0.1% BSA), 0.3% SDS, 100 µg/ml DNA de esperma de salmón.
5. Añadir la sonda de DNA, que fue marcada con α -³²P]dATP mediante la técnica de "Nick Translation" (70). Hibridizar durante 12 hr o más, a 42°C.
 6. Lavar los filtros: a) una vez durante 15 min a 42°C, con 2x SSPE; y b) cuatro veces, durante 15 min cada una, a 42°C con 0.2x SSPE.
 7. Secar los filtros y exponerlos en una placa fotográfica, a -70°C.

SECUENCIACION NUCLEOTIDICA

Los fragmentos de DNA a secuenciarse, fueron marcados previamente en el extremo 3' con fósforo radiactivo, del siguiente modo:

1. Digerir el DNA del plásmido con la endonucleasa de restricción conveniente -de acuerdo a la región del DNA que se desea secuenciar-.
2. Incubar la muestra antes digerida con α -³²P]dATP, nucleótidos dGTP, dCTP, dTTP (cada uno a una concentración final de 50 µM) y 1 unidad de Klenow, durante 30 min a temperatura ambiente.
3. Agregar dATP frío a una concentración final de 100 µM. Incubar la reacción durante 30 min a temperatura ambiente.
4. Inactivar la enzima calentando a 70°C, durante 10 min.
5. Someter la muestra a la acción de una segunda endonucleasa, con el fin de separar los extremos 3' marcados.
6. Separar, en un gel de agarosa de bajo punto de fusión (1.5%), los fragmentos generados por las endonucleasas. Cubrir el gel con una película delgada de plástico (Kleen Pack) y ponerlo en contacto con una placa fotográfica

7. Exponer la placa fotográfica de 15 min a 1 hr.
8. Detectar, mediante la placa revelada, los fragmentos marcados radiactivamente, para posteriormente separar del gel las bandas deseadas.
9. Fundir la agarosa a 65°C, extraer el DNA con fenol y cloroformo; precipitar con etanol y NaCl.
10. Resuspender el precipitado en 110 µl de H₂O desionizada y dividir en cuatro alícuotas, que se utilizan para las cuatro reacciones de secuenciación nucleotídica descritos por Maxam y Gilbert (71). Su técnica de secuenciación se basa en la modificación parcial y selectiva de bases -con ciertos reactivos químicos- para posteriormente cortar con piperidina, el enlace fosfo-diéster del nucleótido modificado.
11. Los fragmentos de DNA producidos en el paso anterior, y marcados en el extremo 3' se separan en geles (40 cm de largo y 0.75 mm de espesor) de acrilamida-bisacrilamida (19:1) y 7M Urea. La electroforesis se efectúa a 50 Watts hasta que el xilen-cianol migre 12 cm a lo largo del gel.
12. Para obtener la autorradiografía, cubrir el gel con una película de plástico y exponerlo, en contacto con una placa fotográfica, durante 2 ó 3 días, a -70°C.

INDUCCION DE LA EXPRESION

Para inducir la expresión de genes a partir del promotor P1 del bacteriófago lambda, se siguió la técnica descrita por Mott E. y col. (72), consistente en:

1. Crecer las transformantes en medio máximo de inducción (MX) a 28°C, durante toda la noche.

2. Con 1/100 de este cultivo bacteriano, inocular 20 ml de MX con ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$). Incubar a 28°C hasta una densidad óptica de 1, a 550 nm.
3. Separar 1 ml de la muestra anterior, para utilizarla como control no inducido y agregar al resto del cultivo un volumen igual de MX precalentado a 65°C.
4. Incubar durante 12 hr o más, a 42°C.
5. Enfriar las muestras en hielo. Tomar una alícuota de 1 ml y centrifugar a 12,000 x g durante 1 min. Lavar con TE (10mM Tris pH 7.5, 0.1mM EDTA) y resuspender en 50 μl de solución disruptora (50mM Tris pH 6.8, 10% glicerol, 1% SDS, 2mM EDTA, azul de bromofenol y 10 $\mu\text{l/ml}$ de β -mercaptoetanol).
6. Hervir durante 3 min, centrifugar en Eppendorf por 5 min y colocar la muestra en un gel de acrilamida-SDS.

ELECTROFORESIS EN GELES DE ACRILAMIDA

Se utilizaron geles de acrilamida-SDS de acuerdo al sistema descrito por Laemmli (73). Los geles se preparan en dos partes: la inferior consistente en 10 ó 15% de acrilamida-bisacrilamida (30:0.8) en solución amortiguadora de Tris pH 8.8; la parte superior, se hace con 5% de acrilamida-bisacrilamida (30:0.8) en solución de Tris pH 6.8. Esta discontinuidad del gel ayuda a concentrar las muestras en la parte superior, obteniendo así una mejor separación.

Se utiliza Tris-glicina como solución de corrida. La electroforesis se efectúa a 10 mA hasta que el azul de bromofenol alcanza el gel inferior, entonces se aumenta la corriente a 20 mA hasta que el colorante salga del gel. Posteriormente, los geles se fijan y tiñen con una solución al 30% de metanol, 10% de ácido acético y 0.06% de azul brillante de Coomassie.

Para medir el porcentaje de las proteínas de interés, con respecto al total de las proteínas sintetizadas en E. coli, se hacen curvas densitométricas,

a 600 nm, de los geles teñidos. Para ello se utiliza un espectrofotómetro Gilford modelo 250, adaptado con un transportador lineal Gilford modelo 2410s.

INMUNOELECTROTRANSFERENCIA

Para la detección de proteínas específicas se siguió el método "Western", consistente en:

1. Separar las proteínas en geles al 10% de acrilamida-bisacrilamida (30:0.8).
2. Transferir las proteínas a un papel de nitrocelulosa (BA85), humedecido con solución de transferencia (0.025M Tris pH 8.35, 0.193M glicina, 20% metanol) y colocarlo entre dos papeles filtro igualmente humedecidos. La transferencia se lleva a cabo a 1 Amperio, durante 3 hr.
3. Para corroborar la eficiencia del método, se tiñe alguno de los carriles de nitrocelulosa con amido negro (0.1 g de amido negro, 45 ml de metanol, 10% de ácido acético, 45 ml de H₂O) y se revela con una solución de 90% de metanol y 2% de ácido acético.
4. Después de la transferencia, los papeles de nitrocelulosa se incuban durante toda la noche en amortiguador de gelatina TNTG (10mM Tris pH 7.4, 0.9% NaCl, 0.3% de Tween, 3% de gelatina).
5. Los papeles de nitrocelulosa se colocan en bolsas de plástico, donde se agregan los antisueros diluidos en TNTG.
6. Incubar a 37°C, durante 90 min.
7. Lavar los papeles 4 veces en TNTG, con agitación, 15 min cada una.
8. Incubar 1 hr a 37°C con 0.5 uCi/ml de proteína A de S. aureus, marcada con I¹²⁵ y disuelta en TNTG.
9. Remover la proteína A-I¹²⁵ que no se haya pegado, lavando los filtros

cuatro veces en TNT6, según lo indicado en el paso 7.

10. Dejar que los papeles se sequen al aire y exponerlos para autorradiografía.

ENRIQUECIMIENTO DE LA PROTEINA HIBRIDA

Para obtener mayor proporción de la proteína de interés sintetizada en E. coli, se siguió la siguiente técnica:

1. Las bacterias recombinantes se colectan por centrifugación a 4,000 x g, durante 10 min a 4°C.
2. Resuspender en 1/10 del volumen inicial de TEN (50mM Tris pH 7.5, 0.5mM EDTA, 0.3M NaCl) y añadir 1 mg/ml de lisozima, dejando 15 min en hielo.
3. Agregar NP-40 a una concentración final de 0.5%, dejando 10 min en hielo.
4. Agregar a la muestra 1/5 del volumen inicial de 1.5M NaCl y 12mM MgCl y agitar sobre hielo, junto con 2 ug/ml de deoxirribonucleasa, durante 1 hr.
5. Centrifugar a 4,000 x g por 15 min, a 4°C.
6. Separar el sobrenadante y lavar el precipitado tres veces con TEN.
7. Resuspender el precipitado en TEN.

RESULTADOS

CONSTRUCCION DE UN PLASMIDO PARA LA EXPRESION DEL GENE 4(5') DEL ROTAVIRUS DE SIMIO SA11

El plásmido pSR4-2 utilizado, contiene un fragmento de cDNA que corresponde al extremo 5' del gene 4 de SA11; fragmento 4(5'). Dicho fragmento codifica para un polipéptido que denominamos VP8' y que abarca la secuencia de VP8 (excepción hecha de los primeros tres aminoácidos) y 167 ó 173 aminoácidos (dependiendo del sitio de corte con tripsina) correspondientes a VP5 (ver fig.4A).

Para dirigir la síntesis del polipéptido VP8' en E. coli, se seleccionó el vector pPLc24 (derivado de pBR322), que cuenta con el promotor izquierdo PL del bacteriófago lambda. PL es un promotor fuerte cuya actividad es regulable por el producto del gene cI del fago lambda (74). Como el plásmido pPLc24 no cuenta con el gene cI que codifica para el represor, la expresión regulada de genes, a partir de dicho promotor, se lleva a cabo en cepas de E. coli que producen un represor termosensible de PL. De este modo, estas bacterias transformadas con el plásmido, se crecen a una temperatura que no inhiba la actividad del represor, y una vez alcanzado el crecimiento deseado el represor se inactiva, mediante la elevación brusca de la temperatura del cultivo, para inducir la expresión del gene.

Adyacente a la región operador-promotor PL del plásmido pPLc24, se encuentra una región nut. Se sabe que los sitios nut, junto con el producto del gene N del fago lambda, impiden la terminación prematura de la transcripción inicia-

da en PL o PR. Por esta razón se utilizan cepas de E. coli con un lambda integrado que tenga un gene N activo, de tal manera que el producto de este gene, junto con el sitio nut del plásmido, sea capaz de impedir una terminación prematura debido a la posible presencia, en el fragmento clonado, de regiones de terminación similares a las que ocurren en lambda.

Inmediatamente después de la región nut antes mencionada, se encuentra una secuencia de DNA que tiene el sitio de unión de ribosomas, así como la información que codifica a los primeros 98 aminoácidos de la polimerasa del bacteriófago MS2. A continuación, se localiza una secuencia "linker" donde se ubican los sitios de corte para las enzimas de restricción BamHI y HindIII (separados por 10 nucleótidos). El uso de este vector posibilita que cualquier segmento de DNA que se inserte en alguno de estos sitios, se exprese bajo la dirección del promotor PL, a condición de encontrarse en la misma fase codificadora de la polimerasa MS2.

La figura 4B nos muestra la estrategia empleada en la construcción de un vector que dirige la síntesis de VP8'. El plásmido pSR4-2 fue digerido con la endonucleasa HhaI. El fragmento 4(5') resultante, de 1043 pares de bases (1039 después de digerir con Klenow), codifica aproximadamente el 85% de VP8 y el 35% de VP5, lo que representa cerca del 45% de VP3.

Con la ligasa de DNA del fago T4, el inserto 4(5') se ligó al sitio HindIII del vector pPLc24, tratado con fosfatasa alcalina para evitar su recircularización. Previamente, fueron rasurados los extremos sobresalientes de los dos fragmentos de DNA para que fueran compatibles en la reacción de ligasa. Para los extremos 3' sobresalientes, generados por HhaI, se utilizó la actividad de exonucleasa del fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de E. coli:

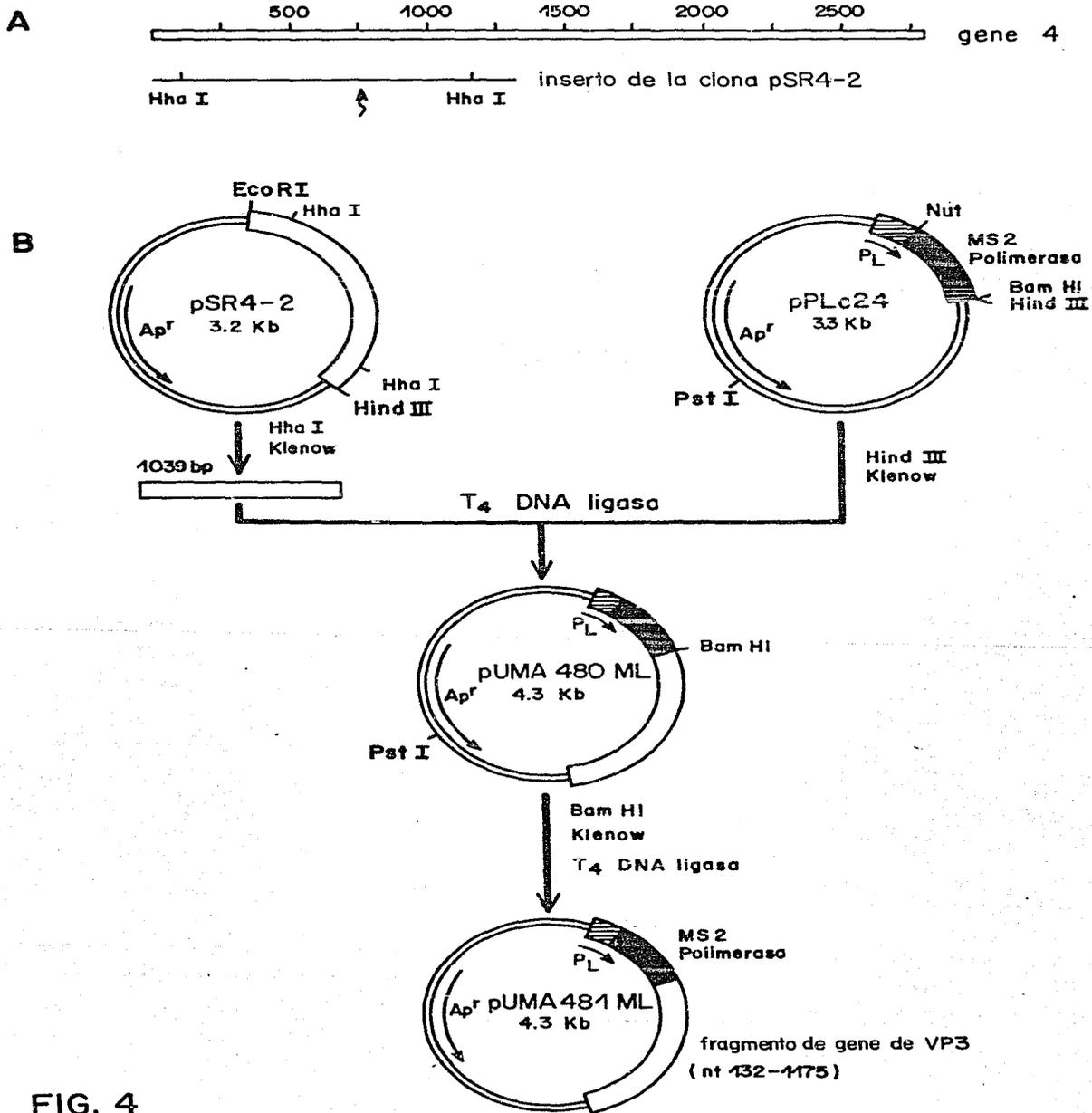


FIG. 4

Figura 4.-

Construcción de un vector de expresión para el gene 4(5') de rotavirus SA11. A) Posición relativa, con respecto a la longitud completa del gene 4, del inserto de cDNA viral contenido en el plásmido pSR4-2. El inserto contiene del nucleótido 19 hasta el 1251 del gene 4. La flecha señala la región del sitio de corte con tripsina asociada con el aumento de infectividad del rotavirus SA11. B) Secuencia de eventos en la construcción del plásmido de expresión pUMA481ML.

mientras que para rellenar los extremos 3' recesivos, generados por HindIII, se utilizó la actividad de polimerasa de la misma enzima. Vector e inserto tratados de la manera descrita, se unieron añadiendo un exceso de 2 molar de inserto, para favorecer la formación de híbridos.

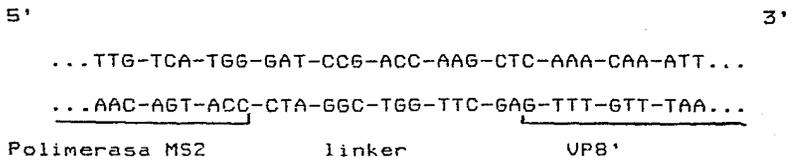
Las nuevas moléculas de DNA fueron recuperadas mediante su transformación en la cepa RR1 de E. coli. Esta cepa produce las moléculas de represor capaces de inhibir completamente al promotor PL (ver Materiales y Métodos); aunque este represor no es termosensible y no permite la desrepresión, con la cepa RR1 se logra obtener una alta eficiencia en la transformación (6×10^6 col/ μ g de plásmido), facilitando la selección inicial de los plásmidos recombinantes.

Mediante la hibridización en colonia, las bacterias transformantes resistentes a ampicilina fueron seleccionadas por su capacidad de hibridizar con el inserto 4(5'), aislado de la clona pSR4-2 con las enzimas EcoRI y HindIII y marcado con [α - 32 P]dATP, mediante la técnica de "Nick Translation" (69). Casi todas las colonias obtenidas contenían el inserto viral.

La secuencia nucleotídica en la región de la fusión, se estableció mediante la técnica de Maxam y Gilbert. Para ello, los plásmidos híbridos fueron digeridos con la endonucleasa BamHI (ver fig. 4B) y los extremos 3' generados se marcaron con [α - 32 P]dATP, usando el fragmento Klenow. Los plásmidos linealizados se cortaron con la enzima PstI, con el fin de aislar los segmentos de DNA (marcados en un sólo extremo) en geles de agarosa.

La secuencia obtenida de los insertos que estaban en la orientación correcta, mostró que el marco de lectura del gene 4(5') estaba desfasado en relación a la secuencia de la polimerasa MS2. Al plásmido híbrido que contenía

este gene fuera de fase, se le llamo pUMA480ML. La secuencia fue la siguiente:

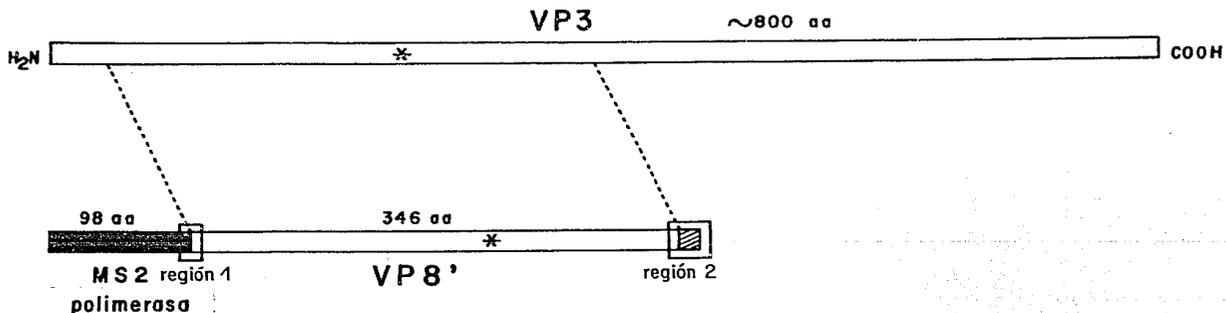


El primer codon TGG (aminoacido triptofano) corresponde a la posicion 98 de la polimerasa MS2.

Para corregir el marco de lectura del pUMA480ML, el plasmido se digirio con BamHI, los extremos 3' sobresalientes se rellenaron con el fragmento Klenow, y el plasmido se recircularizo sobre si mismo con ligasa de DNA del fago T4. De este proceso resulto una insercion de cuatro pares de bases en el sitio de fusion, lo que dejo al gene 4(5') en una fase de lectura continua con respecto al gene de la polimerasa MS2. A este nuevo plasmido se le denomino pUMA481ML.

El conocimiento de la secuencia del gene de la polimerasa MS2, del plasmido pBR322 y del inserto 4(5') originado del gene 4 del rotavirus SA11, permite predecir que en el primer codon AUG de la polimerasa MS2 [localizado a 312 nucleotidos del gene 4(5')], se iniciara la traduccion de la proteina hibrida; mientras que esta finalizara en el codon UGA ubicado en la secuencia del vector pPLc24 (45 nucleotidos despues del inserto). El polipeptido de fusion esperado consiste en 415 aminoacidos: 98 de la polimerasa MS2; 6 codificados por el vector en la union MS2-VP8'(linker); 346 correspondientes a VP8'; y finalmente,

A



B

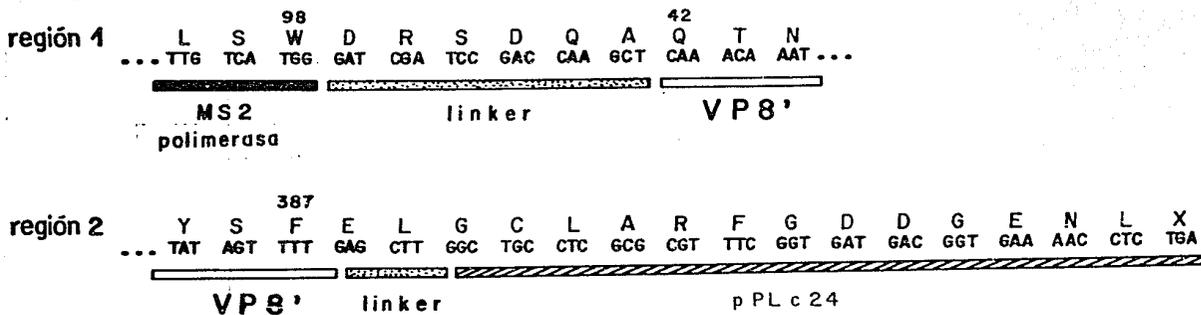


FIG. 5

Figura 5.-

A) Representación de MS2-VP8', polipéptido híbrido esperado de la expresión del pUMA481ML. El asterisco indica el sitio de rompimiento con tripsina. B) Secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de las uniones encuadradas en (A), predichas de acuerdo a la construcción del plásmido. Los números que aparecen sobre los aminoácidos señalan su posición en la proteína original. El codón de terminación de la traducción se indica con una X.

los 15 codificados por el pPLc24 (ver fig. 5). De acuerdo a la composición de aminoácidos, el peso molecular teórico de este polipéptido es de 50,631 daltones.

El plásmido pUMA481ML fue introducido en la cepa RR1 y posteriormente, fue transferido a la cepa MS219 de E. coli. Esta última es la cepa que tiene integrado un profago defectivo de lambda que codifica para un producto funcional del gene N y para un represor termosensible de PL (producto del gene ϕI857). En MS219 se obtuvo una eficiencia en transformación de 4×10^6 col/ μ g de plásmido.

EXPRESION DEL GENE 4(5') DEL ROTAVIRUS SA11

En la cepa de E. coli MS219, la transcripción a partir del promotor PL del plásmido, puede inducirse al elevar la temperatura del cultivo en crecimiento, de 28°C a 42°C. A esta nueva temperatura, el represor de PL se inactiva.

Los cultivos de las bacterias transformadas con los plásmidos pUMA480ML y pUMA481ML (crecidos a 28°C), fueron incubados a 42°C. Posteriormente se tomaron alícuotas de las distintas bacterias recombinantes, para el análisis de las proteínas totales mediante electroforesis en geles de acrilamida-SDS. En las muestras tomadas 12 horas después de la inducción, se observó la presencia de algunas proteínas que no fueron sintetizadas por las bacterias sin inducir (ver fig. 6A carriles 1 y 2). En este momento, se apreció en el extracto con el pUMA481ML, la presencia de un polipéptido con un peso molecular aproximado de 52 Kd (ver fig. 6A carril 2), valor muy cercano a los 50.6 Kd del péptido híbrido MS2-VP8', esperado en la construcción. Esta banda no se observó en la cepa transformada con el pUMA480ML.

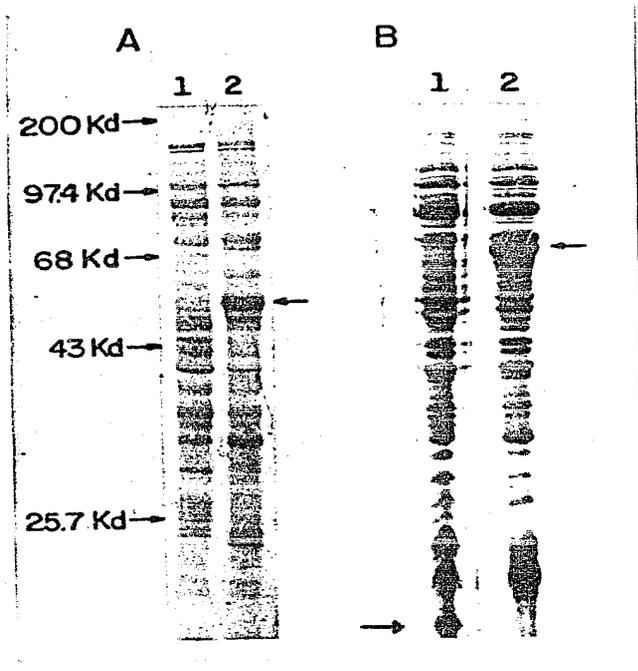


Figura 6.-

A) Gel de poliacrilamida-SDS al 10%, en el cual se analizaron las proteínas totales sintetizadas en la cepa M5219 de *E. coli* con el pUMA481ML, antes de inducir (carril 1) y después de 12 horas de inducción con temperatura (carril 2). La flecha del carril 2, señala a la supuesta proteína MS2-VP8'. Los marcadores de peso molecular son: miosina (cadena pesada), de 200 Kd; fosforilasa B, de 97 Kd; albúmina de suero bovino, de 68 Kd; ovalbúmina, de 43 Kd; quimotripsinógeno, de 27.5 Kd.- B) Análisis en un gel al 15%, de las proteínas totales de la cepa M5219 conteniendo al plásmido pPLc24 (carril 1) o con el pUMA481ML después de 12 horas de inducción (carril 2). Las proteínas se observan mediante su tinción con azul Coomassie. La flecha superior señala a la proteína de interés MS2-VP8'. La flecha inferior indica la posición de una proteína de 12 Kd, que aparece en las bacterias con el plásmido pPLc24.

Como se sabe que algunas proteínas bacterianas se inducen o repriman con calor (76), se analizaron las proteínas sintetizadas, después de la inducción, en las cepas MS219 transformadas con el pUMA481ML y con el pPLc24. A las 12 horas de inducción, los extractos difirieron en la producción de la proteína de 52 Kd, exclusivamente en las bacterias con el pUMA481ML; y en una proteína de 12 Kd, en las bacterias con el pPLc24 (ver fig. 6B carriles 1 y 2). Las dos proteínas parecen corresponder, respectivamente, al híbrido MS2-VP8' y a los 98 aminoácidos del gene de la polimerasa MS2. Concluimos entonces que esto es privativo de cada cepa transformante y no resulta de una inducción inespecífica con calor.

Para cuantificar a la proteína de 52 kd sintetizada en las bacterias recombinantes, se efectuó un análisis densitométrico de diferentes extractos bacterianos (en estado de inducción), conteniendo al plásmido pUMA481ML. Las proteínas se separaron en un gel de acrilamida al 10% y se tiñeron con Coomassie. Su análisis mostró que el polipéptido en cuestión representa, aproximadamente, un 15% de las proteínas totales.

IDENTIFICACION INMUNOLOGICA DEL POLIPEPTIDO MS2-VP8'

Con el fin de determinar si la proteína obtenida presentaba determinantes antigénicos relacionados con el rotavirus SA11, se prepararon proteínas totales de bacterias MS219 portadoras del plásmido pUMA480ML y del pUMA481ML, previamente inducidos durante 12 horas (ver Materiales y Métodos). Aproximadamente 10 µg de proteína total de cada uno de los extractos bacterianos, se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 10% (ver fig. 7 ca-

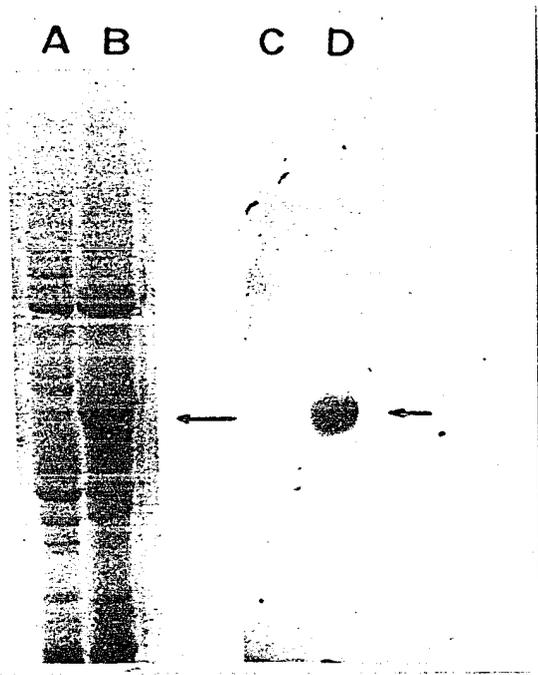


Figura 7.-

Análisis, por inmunoelectrotransferencia, de las proteínas sintetizadas por las bacterias recombinantes. El lisado de proteínas de la cepa MS219 de E. coli (inducida con calor durante 12 horas), conteniendo al pUMA480ML (carriles A y C), o al pUMA481ML (carriles B y D) se separaron en un gel de acrilamida al 10% y se tiñeron con azul de Coomassie (carriles A y B) o fueron transferidas a papel de nitrocelulosa (carriles C y D). Las proteínas transferidas se incubaron con una dilución 1/500, de suero de cobayo anti-SA11. El anticuerpo unido se identificó con proteína A-I¹²⁵, de S. aureus. La flecha muestra a la supuesta proteína MS2-VP8'.

carriles A a D) y posteriormente, se tiñeron con Coomassie (carriles A y B) o se transfirieron a filtros de nitrocelulosa (carriles C y D). Los filtros se incubaron: primero, con un suero antirotavirus SA11 (producido en cobayo) en una dilución 1/500 y luego, con proteína A de S. aureus marcada con I¹²⁵. Posteriormente, los papeles se lavaron exhaustivamente para evitar la adhesión inespecífica de marca radiactiva. La figura 7 (carriles C y D) muestra la autorradiografía de esta inmunoelectrotransferencia. Se observa que los anticuerpos dirigidos contra SA11 reaccionaron específicamente con la proteína de 52 Kd (carril D) sintetizada solamente en la bacteria con el pUMA481ML. Una proteína de menor peso molecular reaccionó con el antiSA11. Esta misma proteína apareció en la cepa con el pUMA480ML, cuyo inserto 4(5') está fuera de fase con respecto al gene de MS2 (carril C). Estos resultados sugieren que el polipéptido MS2-VP8' es el producto de fusión esperado.

ENRIQUECIMIENTO DE LA PROTEINA HIBRIDA

Las bacterias en estado de inducción, transformadas con el pUMA481ML, fueron tratadas con lisozima para romper la pared celular; y con NP-40 para solubilizar las membranas. Después de centrifugar a baja velocidad se analizaron, en geles de acrilamida-SDS, las proteínas insolubles recuperadas del precipitado (ver fig. 8 carril 2), así como las solubles obtenidas del sobrenadante (carril 3). En esta forma encontramos a MS2-VP8' enriquecida entre las proteínas insolubles precipitadas, representando ahora más del 40% del total de las proteínas celulares.

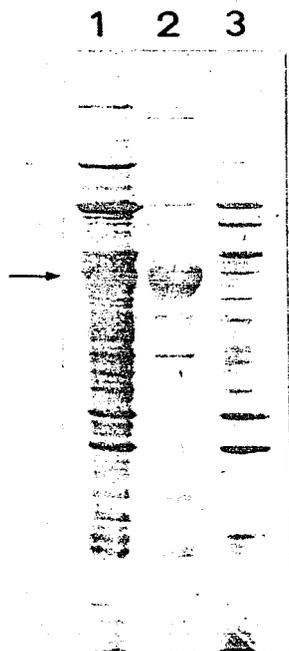


Figura 8.-

Enriquecimiento de la proteína híbrida. En un gel de acrilamida al 10%, se analizaron las proteínas de las bacterias (con el pUMA481ML) en estado de inducción, que fueron tratadas con lisozima y NP40 y, centrifugadas a baja velocidad. 1) Proteínas totales, obtenidas antes del tratamiento descrito. 2) Proteínas recuperadas del precipitado. 3) Proteínas recuperadas del sobrenadante. La flecha señala la proteína MS2-VP8'.

DISCUSION

El resultado de este trabajo es la expresión, en E. coli, del fragmento 4(5') del gene 4 del rotavirus SA11 que, junto con un fragmento del gene de la polimerasa MS2, dió como producto la proteína híbrida MS2-VP8'. Tenemos la certeza de haber logrado la síntesis de la proteína mencionada, pues se obtuvo un producto bacteriano de 52 Kd (valor muy cercano a los 50.6 Kd esperados en la construcción del plásmido), que reaccionó con los anticuerpos dirigidos contra los viriones de SA11 con capa externa. Esto indica que algunos de los determinantes antigénicos de VP3, están presentes en dicho producto.

Los anticuerpos anti-SA11 también reaccionaron con otra proteína de menor peso molecular; sin embargo, se descarta la posibilidad de su origen viral, ya que apareció tanto en el extracto que contiene al plásmido con el gene viral fuera de fase (pUMA480ML), como en las células transformadas con el pUMA481ML. La reacción de esta proteína se debe, presumiblemente, a la presencia en el suero, de anticuerpos dirigidos contra algún determinante bacteriano.

La expresión del fragmento 4(5') depende de la inducción controlada de su transcripción, a partir del promotor PL. La cepa de E. coli utilizada (MS219), produce suficientes moléculas del represor de PL, mismas que mantienen una inhibición total de la expresión del gene viral clonado. El polipéptido MS2-VP8', no aparece hasta que el represor se inactiva al elevar la temperatura del cultivo celular; es entonces cuando comienza la síntesis de la proteína híbrida de 52 Kd.

A las 12 horas de iniciada su síntesis, MS2-VP8' alcanza una cantidad que se mantiene constante, al menos 36 horas después de la inducción. Este resultado nos permite suponer: o bien una estabilidad de MS2-VP8', probablemente debido a su síntesis en forma híbrida (esto es, incluyendo un polipéptido de origen procariote); o bien un proceso de degradación y síntesis que mantiene constante la cantidad que la proteína alcanza a las 12 horas.

La secuencia de aminoácidos codificada por el inserto en el plásmido pSR4-2, carece de los tres aminoácidos amino terminales de la proteína VP3 (77). Por ello, para lograr su expresión, se utilizó un vector que contenía el codón inicial de la polimerasa MS2. El fragmento del gene 4 que se clonó en el vector de expresión pPLc24, abarca la región comprendida entre el aminoácido 42 y el 387 de la secuencia de VP3. Como el polipéptido VP8 termina en el aminoácido 241, el polipéptido híbrido sintetizado en *E. coli*, debe contener el 85% de la secuencia carboxilo terminal de VP8 y aproximadamente, el 35% de la secuencia amino terminal de VP5, incluyendo la región correspondiente al sitio de corte con tripsina (del aminoácido 241 al 247).

En el sistema descrito, la proteína MS2-VP8' sintetizada, representa alrededor de un 15% del total de las proteínas celulares bacterianas; proporción que se puede aumentar hasta llegar a más del 40%, utilizando la propiedad de esta proteína de precipitar mediante el centrifugado a baja velocidad de las bacterias lisadas. Este enriquecimiento puede resultar favorable para la posterior caracterización de MS2-VP8', ya que permite obtener en una forma relativamente pura, hasta 112 mg de la proteína híbrida por litro de cultivo bacteriano. Sin embargo, debido a que una caracterización fina de la proteína probablemente requiera un mayor grado de pureza de la misma, hay que contem-

plar la necesidad de utilizar otros métodos que permitan recuperarla libre de proteínas bacterianas.

El desarrollo de una vacuna efectiva contra rotavirus puede favorecerse con el conocimiento sobre la naturaleza antigénica del virus y en particular, de los determinantes específicos involucrados en el proceso de neutralización. Estudios a este respecto podrían facilitarse gracias a la disponibilidad de MS2-VP8', proteína híbrida cuya obtención reporta el presente trabajo.

Sabemos que la secuencia de aminoácidos de la región asociada con el aumento de infectividad causado por tripsina, es similar en algunos rotavirus que pertenecen a distintos serotipos (52). Esto sugiere que esta región de VP3 puede ser responsable de inducir los anticuerpos neutralizantes heterotípicos descritos. Luego entonces, parece importante probar la capacidad de la proteína MS2-VP8' para inducir anticuerpos que neutralizan a rotavirus pertenecientes a serotipos diferentes al de SA11.

Debido a que MS2-VP8' contiene solo una región de VP3, su estudio pudiera permitir localizar en la molécula, otras funciones de la proteína viral, como son la hemaglutinación y la adsorción y/o penetración a la célula huésped. Sin embargo, para la localización de tales funciones, podría ser necesario sintetizar la proteína completa o regiones de VP3 no contenidas en MS2-VP8'. Esto pudiera lograrse utilizando el sistema aquí reportado, o alguno que permita la expresión de polipéptidos cuya estructura sea lo más cercano posible a la de la proteína nativa.

Este no es el primer reporte de un gene de rotavirus expresado en *E. coli*. VP7, el otro polipéptido de la capa externa, responsable de la inducción de anticuerpos neutralizantes, se ha logrado sintetizar bajo el control del promotor del operón de lactosa (78). La disponibilidad de estas proteínas capaces de inducir anticuerpos neutralizantes, nos permitirá probar su capacidad para proteger contra las infecciones causadas por rotavirus. De este modo, las porciones antigénicamente relevantes de VP3 y VP7 (producidas en bacterias), solas o combinadas, representan una alternativa en la posible producción de una vacuna contra rotavirus, que también pudiera ser funcional contra diferentes serotipos.

ANEXO I

Cuadro 4. Porcentaje de distribución de las defunciones en niños menores de un año y de 1 a 4 años, según determinados grupos de causas,* en países seleccionados de las Américas, alrededor de 1979.

País	Menores de un año									Total
	Año	A	B	C	D	E	F	G	H	
Argentina	1979	11,8	10,4	37,0	10,0	2,5	0,3	13,6	14,4	100,0
Barbados	1978	16,0	4,0	48,0	11,2	3,2	1,6	10,8	5,2	100,0
Colombia	1977	23,7	23,2	22,0	8,9	1,0	0,2	9,9	11,1	100,0
Costa Rica	1979	12,7	9,8	38,1	7,2	1,4	0,8	8,2	21,8	100,0
Cuba	1978	14,2	8,7	43,1	6,9	b	0,4	6,1	20,6	100,0
El Salvador	1974	14,7	25,1	16,1	6,0	0,4	0,1	7,6	30,0	100,0
Guatemala	1978	21,7	19,2	29,1	10,6	b	0,1	5,8	13,5	100,0
México	1976	30,1	25,3	17,3	6,9	2,0	0,2	3,0	15,2	100,0
Nicaragua	1977	10,2	36,5	2,1	14,4	0,7	0,2	7,3	28,6	100,0
República Dominicana	1978	8,3	17,2	17,5	14,4	0,6	0,2	11,0	20,8	100,0
Trinidad y Tabago	1977	13,8	27,5	40,8	2,0	2,2	0,2	7,0	10,9	100,0
Uruguay	1978	7,9	11,7	42,9	7,4	1,9	0,2	8,2	19,8	100,0
Venezuela	1978	11,8	18,0	32,5	8,5	2,8	0,2	9,0	17,2	100,0
De 1 a 4 años										
Argentina	1979	13,4	10,9	-	11,9	17,8	5,0	9,7	31,3	100,0
Barbados	1978	34,6	-	-	-	19,2	15,4	7,7	23,1	100,0
Colombia	1977	23,7	23,0	-	17,4	7,3	1,2	3,7	23,8	100,0
Costa Rica	1979	13,1	10,2	-	15,3	21,1	4,0	3,6	32,7	100,0
Cuba	1978	20,5	6,3	-	12,3	b	8,4	5,9	46,6	100,0
El Salvador	1974	11,8	31,8	-	6,1	2,5	0,4	2,7	44,7	100,0
Guatemala	1978	19,6	31,6	-	22,2	b	0,3	5,6	20,7	100,0
México	1976	24,0	26,1	-	16,8	7,7	0,9	4,3	20,2	100,0
Nicaragua	1977	9,5	31,0	-	19,7	4,4	0,7	3,1	31,6	100,0
República Dominicana	1978	14,3	16,8	-	9,7	5,1	0,7	4,7	48,7	100,0
Trinidad y Tabago	1977	15,0	35,3	-	1,5	21,1	3,0	7,5	16,6	100,0
Uruguay	1978	11,8	8,3	-	4,8	21,4	8,7	8,8	49,4	100,0
Venezuela	1978	19,4	16,4	-	10,8	13,6	2,6	10,6	26,6	100,0

Fuente: *Las condiciones de salud en las Américas, 1977-1980*. Washington, D.C., Organización Panamericana de la Salud, 1982 (Publicación Científica No. 427).

*Los grupos están definidos como sigue:

- A - Causas relacionadas con el aparato respiratorio, excluida la tuberculosis (CIE-9, 460-519);
- B - Causas relacionadas con el aparato digestivo, incluidas la enteritis y la disentería (008, 009, 520-579);
- C - Causas de mortalidad perinatal (760-779);
- D - Enfermedades infecciosas y parasitarias (000-007, 010-136);
- E - Accidentes y otras muertes violentas (E800-E999);
- F - Tumores (140-239);
- G - Todas las demás enfermedades, excepto los estados mal definidos y desconocidos; y
- H - Signos, síntomas y estados morbosos mal definidos y causas desconocidas (780-799).

^bSe incluyen en el grupo G.

ANEXO II
GENES Y PROTEINAS DE ROTAVIRUS^a

segmento de RNA genómico	peso molecular del RNA x 10 ⁶	nombre del producto final de la traducción (peso molecular x 10 ³)	localización	funciones asociadas	comentarios
1	2.05	VP1 (125)	cápside interna		
2	1.68	VP2 (94)	cápside interna		se rompe con tripsina para producir los segmentos de 88 y 84 K.
3	1.60				el gene 3 se transcribe pobremente, tanto in vivo como in vitro.
4	1.60	VP3 (88)	cápside externa	restricción del crecimiento en cultivo de células; hemaglutinina; antígeno de neutralización; responsable del aumento en la formación de placas, debido a proteasas.	VP3 se rompe con tripsina para producir los fragmentos de 60 y 28 K.
5	0.98	NS53 (53)			
6	0.81	VP6 (41)	cápside interna	esta proteína contiene a los dos diferentes sitios antigénicos, que corresponden a la especificidad de sub-grupo y al antígeno común de los rotavirus.	
7	0.5	NS34 (34)			los segmentos 7, 8 y 9 difícilmente se pueden separar mediante electroforesis en gales de poliacrilamida; la migración de los genes varía de cepa a cepa.
8	0.5	NS35 (35)			se ha determinado la secuencia completa del gene 8 de SA11, ésta presenta el 96% de homología con la proteína analoga del rotavirus de bovino.
9	0.5	VP7 (37)	cápside externa	antígeno de neutralización; responsable de la especificidad del serotipo; probablemente es importante en la inmunidad protectora.	se ha determinado la secuencia completa del gene 9; la secuencia de aminoácidos deducida, muestra que VP7 tiene una longitud de 326 aminoácidos con dos regiones aminoterminales hidrofóbicas y un sitio único de glicosilación; esta glicoproteína muestra una gran variabilidad electroforética entre aislados virales interdependientes.
10	0.3	NS29 (20)	no estructural o componente menor del virión.	se glicosila convirtiéndose en una proteína de 29 K; tiene un papel importante en el ensamblaje de la cápside externa.	este asignamiento de código para los genes 10 y 11 es real para SA11 y RVH con electroferotipos "largos", pero la posición de estos dos genes se revierte para RVH con un patrón "corto".
11	0.2	VP9 (26)	¿cápside externa?		

^a Los datos se obtuvieron del modelo de rotavirus mejor estudiado: SA11. VP, proteína viral; NS, no-estructural.

REFERENCIAS

1. Schild GC: La mortalidad infantil en las Américas. Boletín Epidemiológico, Organización Panamericana de la Salud 5 No. 4, 1984.
2. Snyder JD, Merson MH: The magnitude of the global problem of acute diarrheal disease: a review of active surveillance data. Bull. WHO 60: 605-613, 1982.
3. Cukor G, Blacklow N: Human viral gastroenteritis. Microb. Rev. 48: 157-179, 1984.
4. Espejo R, Calderón E, González N, Salomón A, Martuscelli A, Romero P: Rotavirus gastroenteritis in hospitalized infants and young children in Mexico City. Lat. Amer. Microbiol. 20:239-246, 1978.
5. Espejo R, Calderón E, González N, Salomón A, Martuscelli A, Romero P: Presence of two distinct types of rotavirus of infants and young children hospitalized with acute gastroenteritis in Mexico City. J. Infect. Dis. 139: 474-477, 1974.
6. Carlson JAK, Middleton PJ, Symansky MT, Huber J, Petric M: Fatal rotavirus gastroenteritis analysis of 21 cases. Am. Dis. Child. 132: 477-479, 1978.
7. Leece, JG, King MW, Mock R: Reovirus like agent associated with fatal diarrhea in neonatal pigs. Infect. Immun. 14: 816-825, 1976.
8. Snodgrass D, Smith W, Gray EW, Herring JA: A rotavirus in lambs with diarrhea. Res. Vet. Sci. 20: 113-117, 1976.
9. McNulty MS: Rotaviruses. J. Gen. Virol. 40: 1-17, 1978.
10. Kapikian AZ, Wyatt RG, Greenberg HB, Kalica AR, Kim HW, Brandt CD, Rodriguez WJ, Parrott RH, Chanock RM: Approaches of immunization of infants and young children against gastroenteritis due to rotaviruses. Rev. Infect. Dis. 2:459-469, 1980.
11. Adams WR, Kraft LM: Epizootic diarrhea of infant mice: identification of the etiologic agent. Science 141:359-360, 1963.

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

12. Malherbe HH, Harwin R, Ulrich M: The cytopathic effect of vervet monkey viruses. S. Afr. Med. J. 37: 407-411, 1963.
13. Mebus CA, Kono M, Underdahl NR, Twiehaus MJ: Cell culture propagation of neonatal calf diarrhea (scours) virus. Can. Vet. 12: 69-72, 1971.
14. Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ: Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. Lancet 2: 1281-1283, 1973.
15. Kapikian ZA, Chanock RM: Rotaviruses. In: Virology, edited by B.N. Fields et al. Raven Press, New York: 863-893, 1985.
16. Davidson GP, Gall DG, Petric M, Butler DG, Hamilton JR: Human rotavirus enteritis induced in conventional piglets: intestinal structure and transport. J. Clin. Invest. 60: 1402, 1977.
17. Adams WR, Kraft LM: Electron microscopic study of the intestinal epithelium of mice infected with the agent of epizootic diarrhea of mice (EDIM virus). Am. J. Pathol. 51: 39-42, 1968.
18. Holmes IH, Rodger SM, Schnagel RP, Ruck BJ, Gust ID, Bishop RF, Barnes GL: Is lactase the receptor and uncoating enzyme for infantile enteritis (rotavirus)? Lancet 1: 1387, 1976.
19. Holmes IH, Ruck BJ, Bishop RF, Davidson: Infantile enteritis viruses: morphogenesis and morphology. Virol. 16: 937, 1975.
20. Schnagl RD, Holmes IH: Characteristics of the genome of human infantile enteritis virus Rotavirus. J. Virol. 19: 267, 1976.
21. Matheus RF: The classification and nomenclature of viruses: summary or results of meetings of the international committee on taxonomy of viruses in the Hague. Intervirology 11: 133-135, 1979.
22. Espejo R, López S, Arias C: Structural polypeptides of simian rotavirus SA11 and effect of trypsin. J. Virol. 37: 156-160, 1981.
23. Cohen J: Ribonucleic acid polymerase activity associated with purified calf

- rotaviruses. J. Gen. Virol. 36: 395-402, 1977.
24. Kalica AR, Garon CF, Wyatt RG, Mebus CA, VanKirt DH, Chanock RM, Kapikian AZ: Differentiation of human and calf reovirus-like agents associated with diarrhea using polyacrilamide gel electrophoresis of RNA. Virol. 74: 86-92, 1976.
25. Barnett RB, Egbert LN, Spendlove RS: Characteristics of calf diarrhea virus ribonucleic acid. Can. J. Comp. Med. 42: 46-53, 1978.
26. Woode GN, Bridger JC, Jones JM, Flewett TH, Bryden AS, Davies HA, White GB: Morphological and antigenic relationships between viruses (rotaviruses) from acute gastroenteritis of children, calves, piglets, mice and foals. Infect. Immunol. 14: 804-811, 1976.
27. Flewett TH, Bryden AS, Davies H, Woode GN, Bridger JC, Derrick JM: Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. Lancet 2: 61-63, 1974.
28. Brandt CD, Kim HW, Yolken RH, Kapikian AZ, Arrobio JD, Rodriguez WJ, Wyatt RG, Chanock RM, Parrot RH: Comparative epidemiology of two rotavirus serotypes and other viral agents associated with pediatric gastroenteritis. Am. J. Epidemiol. 110: 243-249, 1979.
29. Kapikian AZ, Cline WL, Greenberg HB, Wyatt RG, Kalica AR, Banks CE, James HD, Flores J, Chanock RM: Antigenic characterization of human and animal rotaviruses by immune adherence hemagglutination assay (IAHA): Evidence for distinctness of IAHA and neutralization antigens. Infect. Immun. 33: 415-425, 1981.
30. Bastardo JW, McKimm-Breschkin JI, Sonza S, Mercer LD, Holmes IH: Preparation and characterization of antisera of electrophoretically purified SA11 virus polypeptides. Infect. Immun. 34: 641-647, 1981.
31. Greenberg HB, Valdesuso J, VanWyke K, Midthun K, Walzck M, McAuliffe U, Wyatt RG, Kalica AR, Flores J, Hoshino Y: Production and preliminary cha-

- racterization of monoclonal antibodies directed at two surface proteins of Rhesus rotavirus. J. Virol. 47: 267-275, 1983.
32. Greenberg HB, Flores J, Kalica AR, Wyatt RG, Jones R: Gene coding assignments for growth restriction neutralization and subgroup specificities of the W and DS-1 strains of human rotavirus. J. Gen. Virol. 64: 313-320, 1983.
33. Kalica AR, Greenberg HB, Espejo RT, Flores J, Wyatt RG, Kapikian AZ, Chanock RM: Genes of human (strain Wa) and bovine (strain UK) rotaviruses that code for neutralization and subgroup antigens. Virology 112: 385-390, 1981.
34. Wyatt RG, James WD, Pittman AL, Hoshino Y, Greenberg HB, Kalica AR, Flores J, Kapikian AZ: Direct isolation in cell culture of human rotaviruses and their characterization into four serotypes. J. Clin. Microbiol. 18: 310-317, 1983.
35. Wyatt RG, Greenberg HB, Pittman AL, Kalica AR, Flores J, Chanock RM, Kapikian AZ: Definition of human rotavirus serotypes by plaque reduction assay. Infect. Immun. 37: 110-115, 1982.
36. Greenberg HB, Kalica AR, Flores J, Kapikian A, Wyatt R, Jones R, Valdesuso J: Gene coding assignments for rotavirus studied with genetic reassortants and monoclonal antibodies. In: double-stranded RNA viruses, edited by RW Compans and DHL Bishop. Elsevier, Amsterdam. pp 289-302, 1983.
37. Greenberg HB, McAuliffe U, Valdesuso J, Wyatt R, Flores J, Kalica A, Hoshino Y, Singh NH: Serological analysis of the subgroup protein of rotavirus, using monoclonal antibodies. Infect. Immun. 39: 91-99, 1983.
38. Greenberg HB, Wyatt RG, Kapikian AZ, Kalica AR, Flores J, Jones R: Rescue and serotypic characterization of noncultivable human rotavirus by gene reassortment. Infect. Immun. 37: 104-109, 1982.
39. Kalica AR, Flores J, Greenberg HB: Identification of the rotaviral gene that codes for hemagglutination and protease-enhanced plaque formation.

- Virology 125: 194-205, 1983.
40. Arias C, López S, Espejo R: Gene protein products of SA11 simian rotavirus genome. J. Virol. 41: 42-50, 1982.
 41. Smith ML, Lazdins L, Holmes IH: Coding assignments of double stranded RNA segments of SA11 rotavirus established by in vitro translation. J. Virol. 33: 976-982, 1980.
 42. Matsuno S, Inouye S: Purification of an outer capsid glycoprotein of neonatal calf diarrhea virus and preparation of its antisera. Infect. Immun. 39: 155-158, 1983.
 43. Arias C, López S, Bell J, Strauss H: Primary structure of the neutralization antigen of simian rotavirus SA11 as deduced from cDNA sequence. J. Virol. 50: 657-661, 1984.
 44. Elleman TC, Hoyne PA, Dyall-Smith ML, Holmes IH, Azad AA: Nucleotide sequence of the gene coding the serotype-specific glycoprotein of UK bovine rotavirus. Nucleic Acids Res. 11: 4685-4701, 1983.
 45. Glass R, Kleith J, Nakagomi O, Nakagomi T, Askaa J, Kapikian AZ, Chanock RM, Flores J: Nucleotide sequence of the structural glycoprotein VP7 gene of Nebraska calf diarrhea virus rotavirus: comparison with homologous genes from four strains of Human and animal rotaviruses. Virology 141: 292-298, 1985.
 46. López S, Arias C, Bell J, Strauss J, Espejo R: Primary structure of the cleavage site associated with trypsin enhancement of rotavirus SA11 infectivity. Virology 44: 11-19, 1985.
 47. Matsuno S, Inouye S, Kono R: Plaque assay of neonatal calf diarrhea virus and the neutralizing antibody in human sera. J. Clin. Microbiol. 5: 1-5, 1977.
 48. Barnett BB, Spendlove RS, Clark ML: Effect of enzymes on rotavirus infectivity. J. Clin. Microbiol. 10: 111-119, 1979.

49. Purnell W, Choppin, Scheid A: The role of viral glycoproteins in adsorption penetration, and pathogenicity of viruses. Rev. Infect. Dis. 2:40-55, 1980.
50. Richardson CD, Choppin PW: Oligopeptides that specifically inhibit membrane fusion by paramyxoviruses: studies on the site of action. Virology 131: 518-532, 1983.
51. López S, Arias CF, Méndez E, Espejo R: Conservation of the protein region containing the two sites associated with trypsin enhancement of infectivity. Enviado a consideración para su publicación.
52. Kalica AR, Greenberg HB, Flores J: Identification of the rotaviral gene that codes for hemagglutination and protease-enhanced plaque formation. Virology 125: 194-205, 1983.
53. Ikegami N, Akatani K. Abstr. Int. Cong. Virol. W22-2, p209, 1984.
54. Offit PA, Shaw R, Greenberg HB: Passive protection against rotavirus-induced diarrhea by monoclonal antibodies to VP3 and VP7. J. Virol. (In press).
55. Tanaguchi K, Urasawa S, Urasawa T: Preparation and characterization of neutralizing monoclonal antibodies with different reactivity patterns to human rotaviruses. J. Gen Virol. 66: 1045-1053, 1985.
56. Woode GN, Bew Me, Dennis MJ: Studies on cross protection induced in calves by rotavirus of calves, children and foals. Vet. Rec. 103: 32-34, 1978.
57. Zissis G, Lambert JP, Marbehant P, Marrissens D, Lobmann M, Charlier P, Delemen A, Zygraich N: Protection studies in colostrum-deprived piglets a bovine rotavirus vaccine candidate using human rotavirus strains for challenge. J. Infect. Dis. 148: 1061-1068, 1983.
58. Stanway G, Cann A, Haysmann R, Moontford R, Clarke L, Reeve P, Almond J: Nucleic acid sequence of the region of the genome encoding capsid protein VP1 of neurovirulent and attenuated type-3 polioviruses. Eur. J. Biochem. 135: 529-533, 1978.
59. Secondo S: The mayor surface glycoprotein from simian rotavirus SA11

contains distinct epitopes. Virology 134: 318-327, 1984.

60. Hoop TP: Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequence. PNAS 78: 3824-3829, 1978.

61. Gething MJ, Sambrook J: Cell surface expression of influenza haemagglutinin from a cloned DNA copy of the RNA gene. Nature 293: 620-625, 1981.

62. Edman JC, Hallewell RA, Valenzuela P, Goodman H, Rutter W: Synthesis of hepatitis B virus surface and core antigens in E. coli. Nature 291: 503-506, 1981.

63. Watson RJ, Weis JH, Salstrom JS, Enquist LW: Herpes simplex virus type-1 glycoprotein D gene: nucleotide sequence and expression in Escherichia coli. Science 218: 381-383, 1982.

64. Kleid D, Yansura D, Small B, Dowbenko D, Moore DM, Grubman M: Cloned viral protein vaccine for foot-and-mouth disease: responses in cattle. Science 214: 1125-1129, 1981.

65. Smith GL, Macke HM, Mos B: Infectious vaccinia virus recombinants that express hepatitis B virus surface antigen. Nature 302: 490-495, 1983.

66. Cremer K, Whohlenberg CH, Notkins AL, Mackett M, Moss B: Vaccinia virus recombinant that expresses the HSV-1 glycoprotein-D gene protects mice against lethal challenge by HSV-1 or HSV-2 and the establishment of a latent ganglionic infection by HSV-1. In: Vaccines, edited by Cold Spring Harbor Lab. pp. 169-174, 1985.

67. Lathe R, Kieney MP, Lecoq JP, Drillien R: Immunization against rabies using a vaccinia-rabies recombinant virus expressing the surface glycoprotein. In: Vaccines, edited by Cold Spring Harbor Lab. pp. 157-161, 1985.

68. Shih MF, Arsenakis M, Tiollais P, Riozman B: Herpes simplex virus as a vector for eucaryotic viral genes. In: Vaccines, edited by Cold Spring Harbor Lab. pp. 177-180, 1985.

69. Remaut E, Patrick Stanssens, Walter Fiers: Plasmid vectors for high-effi-

- ciency expression controlled by the PL promoter of coliphage lambda. Gene 15: 81-92, 1981.
70. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J: Molecular Cloning edited by Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982.
71. Maxam AM, Gilbert W: Sequencing end labeled DNA with base specific chemical cleavage. Methods Enzymol. 65: 499-559, 1980.
72. Mott J, Grant R, Ho Y, Platt T: Maximizing gene expression from plasmid vectors containing the lambda PL promoter: Strategies for overproducing transcription termination factor P. Proc. Natl. Acad. Sci. 82: 88-92, 1985.
73. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685, 1970.
74. Issacs LN, Echols H, Sly WS: Control of lambda messenger RNA by the cI-immunity region. J. Mol. Biol. 13: 963-967, 1965.
75. Salstrom JS, Sybalski W: Coliphage lambda Nut L : a unique class of mutants defective in the site gene N product. J. Mol. Biol. 124: 195-221, 1978.
76. Cowing DW, Bardwell JCA, Craig EA, Woolford C, Hendrix RW, Gross CA: Consensus sequence for Escherichia coli heat shock promoters. Proc. Natl. Acad. Sci. 82: 2679-2683, 1985.
77. López S. Comunicación personal.
78. Arias C, Ballado T: Synthesis of the outer glycoprotein of the simian rotavirus SA11 in Escherichia coli. Enviado a consideración para su publicación.