



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"CARACTERIZACION DE LOS DOMINIOS DE UNION DE
LAS PROTEINAS DE SUPERFICIE DE ROTAVIRUS A LA
INTEGRINA $\alpha v \beta_3$ Y A LA PROTEINA DE CHOQUE TERMICO
hsc70 UTILIZANDO LA TECNICA DE DESPLIEGUE
EN FAGOS".

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G A
P R E S E N T A :
KARLA OYUKY JUAREZ MORENO

DIRECTOR DE TESIS: DR. CARLOS F. ARIAS ORTIZ



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

2002



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA

Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunico a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Caracterización de los dominios de unión de las proteínas de superficie de rotavirus a la integrina $\alpha v \beta 3$ y a la proteína de choque térmico hsc70 utilizando la técnica de despliegue en fagos."

realizado por Karla Oyuky Juárez Moreno

con número de cuenta 9537529-4, quién cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dr. Carlos Federico Arias Ortiz.

CARLOS F. ARIAS O.

Propietario

Dr. Ernesto Méndez Salinas.

Ernesto Méndez Salinas

Propietario

Dr. Baltazar Becerril Luján.

Suplente

Dra. Susana López Charretón.

Susana López Charretón

Suplente

Dra. Patricia Joseph-Bravo.

Patricia Joseph-Bravo

FACULTAD DE CIENCIAS
U N A M.

Consejo Departamental de Biología.

Juan Manuel Rodríguez Chávez
M.en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez.



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Carlos Federico Arias Ortiz. Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo económico de una beca otorgada por la Fundación Telmex (Folio: 309000867), un apoyo otorgado por el Sistema Nacional de Investigadores y una ayuda económica de alimentación y hospedaje otorgada por el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Dedicatorias.

Por ser amiga y de las mejores, por tu amor, comprensión y apoyo. Por los consejos, las risas y tu enorme fortaleza, ejemplo constante.

A ti mamá, te dedico este trabajo.

Para mis hermanos, tíos y sobrinos, por hacer de cada día algo diferente.

Para una gotita de agua.

Agradecimientos.

Porque en los diferentes momentos de este trabajo fui guiada por uno de los más certeros asesores, quien con empeño y paciencia animó mi desarrollo, gracias Carlos por confiar en mí.

A mi madre, por su incondicional y férreo apoyo, por las risas, los consejos, la fuerza y tanto más...

A Sayo, Yeya, Mon, Jesús, Alan y Martín, por su afán de creer en las cosas, por luchar diariamente, y por contagiarme de ese espíritu.

A mi padre, por sus consejos y apoyo, gracias mil.

Por compartir conmigo esta historia y saber que rojo es el nombre que le hemos dado. Por tu apoyo constante, tus consejos, por el tiempo bueno y malo, pero sobre todo por tu amistad y cariño, ¡Gracias Mack!

A mis amigos: Orestes, Carolina, Magdalena, Carlos, Tzindilú, Iris, Juan, Berenice, Angélica, Blanca, Angel, Vane y Paz desde siempre, saben que los quiero.

A mi comité tutorial por sus certeros comentarios en la revisión de este trabajo.

A Ernesto, Pavel, Tomás, Rafa y Ma. Elena, por la ayuda brindada en las dudas técnicas.

Al Dr. Baltazar Becerril y a la Dra. Consuelo García, por sus valiosas contribuciones y su asesoría.

A la Dra. Patricia Joseph por ese consejo que valió oro.

A Susana y al grupo Arias-López por compartir conmigo este tiempo y por enseñarme el mundo de la virología.

¡A todos, gracias mil!

Karla

ÍNDICE.

Introducción	3
Características de la partícula viral.	4
Proteínas estructurales.	4
Ciclo replicativo.	7
Receptores para rotavirus.	9
Modelo de las primeras interacciones de rotavirus con su célula blanco.	12
Descripción del sistema de despliegue en fagos.	13
Objetivos.	19
Estrategia experimental.	20
Material y métodos.	21
Resultados.....	30
1. Obtención de fagémidos que expresan los péptidos de VP4 y VP7 fusionados a la proteína pIII del fago M13.....	30
2. Detección de la expresión de las proteínas recombinantes.	32
3. Obtención de los fagos recombinantes.	35
4. Determinación de la especificidad de los fagos recombinantes a sus respectivos ligandos (hsc70 ó $\alpha\text{v}\beta\text{3}$).	36
4.1 Unión de los fagos recombinantes <i>fKID</i> y <i>fVP4-30aa</i> a la proteína de choque térmico hsc70.....	36
4.2 Unión de los fagos recombinantes <i>fCNP</i> y <i>fVP7-50aa</i> a la integrina $\alpha\text{v}\beta\text{3}$	38
5. Competencia de la unión de los fagos recombinantes contra los péptidos <i>KID</i> y <i>CNP</i>	39
5.1 Unión de los fagos recombinantes <i>fKID</i> y <i>fVP4-30aa</i> a la proteína de choque térmico hsc70 en presencia de los péptidos sintéticos <i>KID</i> y <i>scr-KID</i>	39
5.2 Unión de los fagos recombinantes <i>fCNP</i> y <i>fVP7-50aa</i> a la integrina $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ en presencia de los péptidos sintéticos <i>CNP</i> y <i>scr-CNP</i>	42
6. Bloqueo de la infectividad de rotavirus en células MA104.	45
Discusión.	46
Bibliografía.	52

INTRODUCCIÓN.

Los rotavirus fueron descubiertos por Bishop y colaboradores en 1973, al observar al microscopio electrónico biopsias de células de intestino delgado de niños con diarrea deshidratante severa. La morfología tan característica de las partículas virales al ser observadas al microscopio electrónico hizo que se les denominaran rotavirus, del latín "rota" que significa rueda, pues semejan a una rueda de carreta (Fig. 1)



Fig.1 Micrografía electrónica de una preparación por tinción negativa de rotavirus de humano. La barra representa 100 nanómetros.

Los rotavirus (38) son los principales agentes etiológicos de diarreas severas no bacterianas en niños menores de tres años y en cachorros de diversas especies de importancia económica para el hombre. Se estima que ocasionan alrededor de un millón de muertes anuales por deshidratación en niños menores de dos años (21).

Los rotavirus han sido clasificados en grupos, los cuales son morfológicamente indistinguibles al microscopio electrónico y contienen el mismo número de genes, pero son distintos antigénicamente. Existen seis grupos, del A al F; los pertenecientes a los grupos A, B y C infectan tanto a humanos como a animales, los rotavirus de los grupos D, E y F sólo se han

identificado en animales. Los rotavirus pertenecientes al grupo A se han identificado como causantes de diarreas severas en niños de 2 años y son los más importantes epidemiológicamente (7).

Características de la partícula viral.

Los rotavirus representan uno de los ocho géneros de la familia *Reoviridae*, son virus de simetría icosaédrica, de 76 nanómetros de diámetro. Carecen de una envoltura lipídica, componiéndose únicamente por tres capas concéntricas de proteínas que

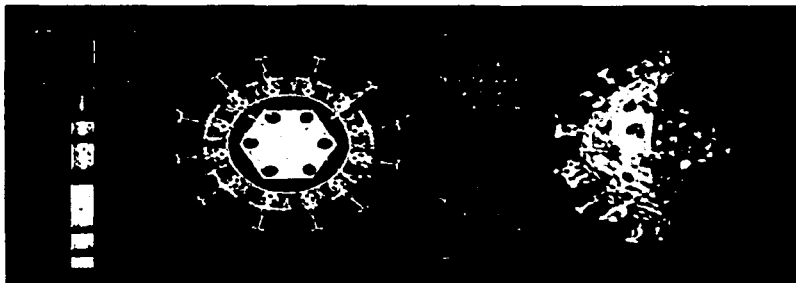


Fig 2. Representación esquemática de la partícula de rotavirus.

Se indican las proteínas estructurales y no estructurales codificadas por su respectivo segmento de RNA, así como también su localización en la partícula tridimensional, determinada por criomicroscopía electrónica

forman la capa externa, intermedia e interna. Las tres capas de proteínas envuelven a un genoma de once segmentos de RNA de doble cadena, los cuales tienen un tamaño que varía entre los 0.6 y 3.3 kilopares de bases (kpb). Cada segmento de RNA codifica para una proteína viral, con excepción del segmento 11 que codifica por dos. Seis son proteínas estructurales (VP1 a VP4, VP6 y VP7) y otras seis son no estructurales (NSP1 a NSP6) (Fig. 2).

Proteínas estructurales.

La nucleocápside del virión está formada por 60 dímeros de la proteína VP2 y 12 moléculas tanto de la proteína VP1 como de VP3. La proteína VP1, de 1088 aminoácidos, es la

polimerasa viral, la cual tiene actividad de RNA polimerasa dependiente de RNA. Esta proteína contiene regiones que tienen homología con motivos conservados entre polimerasas de RNA dependientes de RNA de otros virus. La proteína estructural VP2, producto del gen 2, está formada por 881 aminoácidos y tiene un peso molecular de 94 kDa; es capaz de unir RNA de cadena sencilla o doble, aunque tiene una mayor afinidad por los RNAs de cadena sencilla. La proteína VP3, de 835 aminoácidos, es una proteína básica a la cual se le atribuye la función de guanilil-transferasa del RNA viral (7).

La capa intermedia de la partícula viral está formada por 260 trómeros de VP6, la cual es la proteína más abundante en el virión, ya que constituye el 51% de la masa del virus. VP6 desempeña un papel importante en la estructura del virus, dado que interacciona con las proteínas de capa externa y con VP2 en la nucleocápside. Por lo general, VP6 es el blanco de ensayos de diagnóstico, debido a que contiene epítopes conservados entre las diferentes cepas de rotavirus pertenecientes a un determinado grupo.

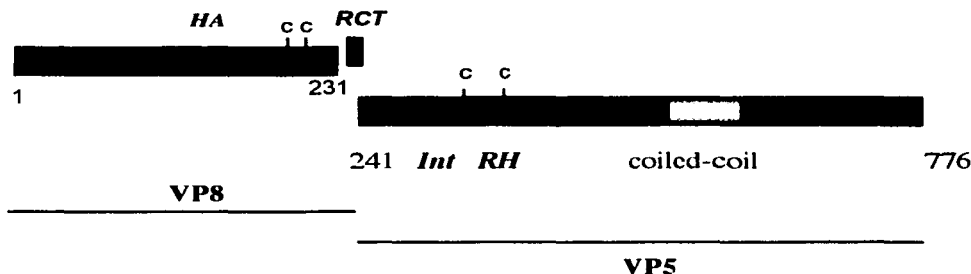
La capa externa del virión la forman las proteínas VP7 y VP4. La proteína VP7 forma la superficie lisa del virión, a partir de la cual se proyectan 60 dímeros de VP4 que forman los "spikes" o espículas de la partícula viral. La segunda proteína más abundante en el virión es VP7, con 780 copias por virus. Es una glicoproteína de 362 aminoácidos con un peso de 37 kDa.

VP4, la otra proteína de la capa externa, es una proteína no glicosilada de 776 aminoácidos con un peso molecular de 88 kDa. Se le han atribuido diferentes funciones como la especificidad de huésped, la unión inicial del virus con la superficie celular y su capacidad de aglutinar eritrocitos (7).

La proteína VP4 se corta con tripsina, en los residuos de arginina 231, 241 y 247, generando dos polipéptidos: VP8, que abarca los aminoácidos 1 al 231 y cuyo peso molecular es de 28 kDa, y VP5 (aminoácidos 247 a 776) con un peso molecular de 60 kDa. Estos polipéptidos representan los extremos amino y carboxilo terminal de VP4, respectivamente (2,

6, 23). La infectividad de los rotavirus depende del corte proteolítico del virus con tripsina. Sin embargo, el mecanismo por el cual dicho corte activa la infectividad viral aún no se conoce. El corte de VP4 con tripsina no afecta la unión del virus a la célula, por lo que está relacionado con un paso posterior, probablemente con la penetración del virus al citoplasma celular (20).

Estudios bioquímicos y moleculares han permitido identificar diferentes dominios funcionales de VP4 mencionados a continuación en la figura 3.



HA: dominio de hemaglutinación
 RCT: región de corte con tripsina.
 Int: sitio de unión a la integrina $\alpha_2\beta_1$
 RH: región hidrofóbica
 c: cisteína

Fig. 3 Representación esquemática de la proteína VP4. Se enlistan los dominios funcionales más relevantes.

El dominio de hemaglutinación comprende los aminoácidos 93 al 208 localizados en VP8 (9). Recientemente se ha encontrado que los residuos de tirosina 155 y 188 y la serina 190, son los aminoácidos que están directamente involucrados (16). Este dominio es el responsable de la interacción con residuos de ácido sálico en la membrana celular. La proteína VP5 contiene la secuencia consenso DGE (Aspártico-Glicina-Glutámico) entre los aminoácidos 308 a 310, que sirve para unir integrinas del tipo $\alpha_2\beta_1$. También en VP5 existe una región altamente hidrofóbica contenida entre los aminoácidos 384 al 401, que presenta una similitud

del 45% con el dominio de fusión de la proteína E1 de los alfavirus (virus Sindbis y Semliki) por lo que se ha propuesto su función como péptido de fusión a la membrana celular para el caso de los rotavirus (26). Existen dos puentes disulfuro intramoleculares entre los residuos de cisteína 203 y 216 y entre los aminoácidos 318 y 380, que se encuentran conservados en las cepas de rotavirus que infectan animales (30). La predicción de la estructura secundaria de VP4 y los estudios recientes basados en criomicroscopía electrónica de la partícula viral acoplada con anticuerpos monoclonales (Fig. 4) indican la existencia de un dominio globular rico en hojas β , que abarca aproximadamente el 60% de la región amino terminal de la proteína, y un dominio rico en α hélices que ocupa el porcentaje restante y que forma la parte basal de la proteína VP5 (35). Una región de 63 aminoácidos localizada en el dominio enriquecido de α hélices, tiene un motivo que forma una estructura de tipo "coiled-coil" (24).

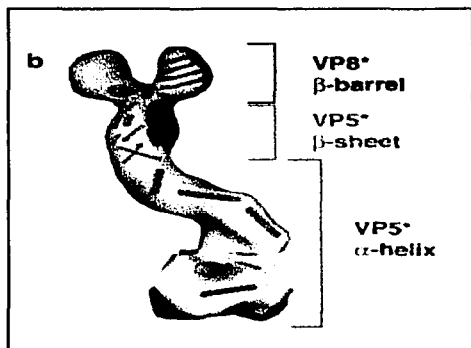


Fig. 4 Representación esquemática de la proteína VP4. Se indica la topología general de VP8 en rojo y de VP5 en verde, determinada por criomicroscopía electrónica y procesamiento de imágenes. Tomada de Tihova, M. y col. 2002.

Ciclo replicativo.

In vivo los rotavirus presentan un tropismo muy específico ya que estos virus sólo infectan los enterocitos diferenciados de las vellosidades del intestino delgado (7). Las primeras interacciones de los rotavirus con su célula huésped involucran los siguientes eventos:

la adsorción del virus, penetración al interior de la célula, desencapsidación de la partícula viral y la activación de la transcripción. Durante el proceso de adsorción la partícula viral se une a través de una de sus proteínas de capa externa a una molécula de la superficie celular que actúa como receptor. En el caso de rotavirus se sabe que algunas cepas del virus se unen inicialmente a un receptor que contiene ácido siálico, mientras que algunas otras no requieren de ácido siálico para su unión inicial. Independientemente de que requieran o no de ácido siálico para unirse a la célula, las diferentes cepas de rotavirus interaccionan, después de la unión inicial, con dos o más moléculas presentes en la superficie celular (1). Se ha establecido que la unión de los rotavirus al receptor que contiene ácido siálico no es esencial, ya que se han aislado variantes del rotavirus RRV (que sí requiere de ácido siálico para infectar a la célula) denominadas nar3, cuya infectividad es independiente de la presencia de estos azúcares en la superficie celular (7, 29). El proceso de penetración, es el mecanismo por el cual el virus ingresa al interior de la célula (aunque en el caso de los rotavirus aún no es claro como se lleva a cabo) durante o inmediatamente después de este evento el virus pierde la capa externa compuesta por las proteínas VP4 y VP7 (7, 25), evento conocido como desencapsidación. Este paso activa la transcripción del genoma viral, sintetizándose así los RNAs mensajeros del virus los cuales tienen dos funciones: como templados para la síntesis de RNAs genómicos y como RNAs mensajeros que dirigen la síntesis de las proteínas del virus. La transcripción, selección, empaquetamiento y morfogénesis de las partículas subvirales o partículas de doble capa o DLPs (del inglés "double-layered particles", que carecen de las proteínas de la capa externa) se lleva a cabo en estructuras electrodensas llamadas viroplasmatas, las cuales contienen grandes cantidades de RNA y proteínas virales. Una vez formadas, las DLPs geman desde el viroplasma hacia el lumén del retículo endoplásmico (RE), adquiriendo de esta manera una membrana lipídica transitoria que se pierde conforme las partículas migran hacia el interior del RE, la envoltura lipídica es reemplazada por las proteínas de superficie del virus, VP4 y VP7. Los viriones maduros son liberados de la célula por lisis celular.

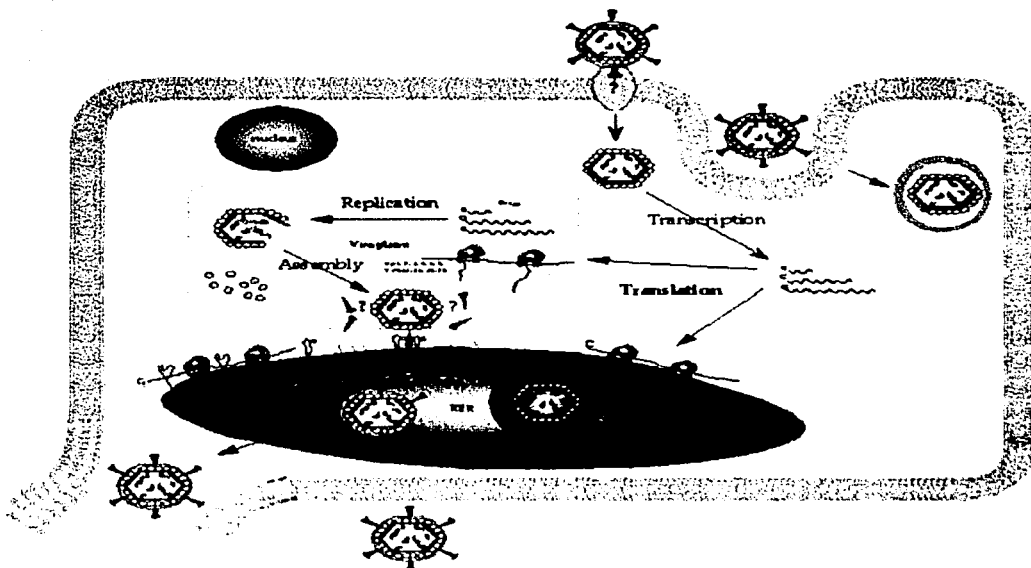


Fig. 5 . Ciclo replicativo de rotavirus.

Receptores para rotavirus.

Las primeras interacciones de un virus con su célula huésped involucran el reconocimiento y la unión específica del virus a el o los receptores localizados en la superficie celular. En el caso de los rotavirus, la evidencia disponible sugiere que durante el proceso de infección, es necesario que las partículas virales interactúen con más de una molécula en la superficie celular, utilizando durante dicho proceso diferentes dominios de las proteínas de la capa externa. Son varios los receptores que se han propuesto y caracterizado para los rotavirus, dentro de los cuales destacan algunas integrinas y la proteína de choque térmico hsc70.

Las integrinas son una familia de proteínas heterodiméricas integrales de la membrana plasmática que están compuestas por una subunidad alfa (α) y una subunidad beta (β). Estas

proteínas participan en las interacciones de la célula con la matriz extracelular y en las interacciones célula-célula. Las integrinas funcionan como señaladoras de una gran variedad de procesos celulares entre los que se encuentran la proliferación, migración y diferenciación celular, entre otros.

Las integrinas son moléculas frecuentemente utilizadas como receptores por diferentes virus, por ejemplo, la integrina $\alpha v\beta 3$ es utilizada como receptor celular por el virus coxsackie A9 (32), por el virus de la fiebre aftosa (18) y por los adenovirus (36). Las integrinas $\alpha 6\beta 1$ y $\alpha 6\beta 4$ son reconocidas como posibles receptores del papilomavirus (8). La integrina $\beta 3$ media la entrada de hantavirus a la célula (10), en tanto que echovirus 1 utiliza a la integrina $\alpha 2\beta 1$ (31) y echovirus 22 reconoce preferencialmente a la integrina $\alpha v\beta 1$ como receptor celular (4).

Recientemente se ha reportado que la proteína de la capa externa de rotavirus VP4 se une a las integrinas $\alpha 2\beta 1$ y $\alpha 4\beta 1$ a través de las secuencias peptídicas DGE (aminoácidos 307 a 309) e IDA (Isoleucina-Aspártico-Alanina) (aminoácidos 541 a 543) respectivamente, las cuales están contenidas en el polipéptido VP5 (14, 41). Zárate y col. reportaron que la cepa de rotavirus nar3, se une a la célula a través de la proteína VP5, mediante la integrina $\alpha 2\beta 1$, además, se ha reportado que las integrinas $\alpha 2\beta 1$ y $\alpha 4\beta 1$, están involucradas en la unión y entrada del rotavirus SA11 en células K562, una línea celular de origen humano derivada de una leucemia mielocítica (1, 14). Por otra parte, recientemente se ha demostrado que la integrina $\alpha v\beta 3$ funciona como un receptor celular común para nar3 y RRV ya que cuando se transfectan células de ovario de hámster chino (CHO), que normalmente son poco permisivas para la infección por rotavirus, con el gene de la integrina $\alpha v\beta 3$, estas células se hacen hasta cuatro veces más susceptibles a la infección viral (12).

Por otro lado, se ha reportado que la proteína de la capa externa VP7 contiene el sitio de unión a la integrina $\alpha x\beta 2$: GPR (Glicina-Prolina-Arginina), y el motivo LDV (Leucina-Aspártico-Valina) que une integrinas de tipo $\alpha 4\beta 1$ (5). Péptidos que incluyen las secuencias

DGE, GPR y LDV, y anticuerpos monoclonales dirigidos contra las integrinas $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha x\beta 2$ bloquean la infección por rotavirus en células de riñón de mono MA104 (5, 11).

Recientemente en nuestro laboratorio se han obtenido, evidencias indirectas de que la proteína VP7 se une a la integrina $\alpha v\beta 3$ a través de una región denominada CNP que comprende los aminoácidos 161 a 169 de la proteína viral. Resultados preliminares indican que un péptido sintético que contiene el tripéptido CNP (Cisteína-Asparagina-Prolina) es capaz de bloquear la infectividad de los rotavirus RRV y nar3 (40). Este péptido, presenta un 66.7% de identidad (6 de 9 aminoácidos) con una región de la proteína G1G2 de hantavirus, la cual se ha reportado que interacciona con la integrina $\beta 3$ de manera independiente al motivo canónico RGD (10).

Otra de las moléculas celulares implicadas en el reconocimiento y unión del rotavirus a su célula huésped es la proteína de choque térmico hsc70. Esta proteína es un miembro constitutivo de la familia hsp70 de proteínas inducibles por calor; es una familia de proteínas altamente conservadas asociadas a un gran número de funciones que incluyen el plegamiento correcto de proteínas, translocación a través de membranas biológicas, ensamblaje y desensamblaje de complejos oligoméricos, entre otras. A pesar de que la localización típica de la proteína hsc70 se ha descrito como citoplasmática y nuclear, y de que no contiene ninguna secuencia que actúe como señal de exportación, se ha observado su presencia en la superficie de varios tipos celulares (11).

El papel de la proteína hsc70 en la entrada de rotavirus a las células MA104 se ha evaluado analizando el efecto de anticuerpos contra la proteína, y la proteína misma, sobre la infectividad viral. Anticuerpos monoclonales contra hsc70 bloquean la infectividad del virus RRV y nar3 cuando estos anticuerpos se preincuban con las células antes de la infección. Es importante hacer notar que a pesar de su efecto sobre la infectividad de los rotavirus, ni los anticuerpos monoclonales, ni la proteína hsc70 son capaces de bloquear la unión del virus a la

célula, por lo que se ha propuesto que hsc70 interacciona con los rotavirus en un paso posterior a la unión del virus a la célula (12).

Resultados obtenidos recientemente por S. Zárate en nuestro laboratorio, sugieren que la proteína de rotavirus VP4 se une a la proteína de choque térmico hsc70 a través de una región comprendida entre los aminoácidos 642 a 659. La mitad carboxilo terminal de la proteína VP5 expresada en *E. coli*, así como un péptido sintético que comprende los aminoácidos 642 a 659 denominado *péptido KID*, son capaces de bloquear la infectividad de los rotavirus RRV y nar3; ambos reactivos bloquean la unión de los virus a la proteína hsc70 en inmunoensayos en fase sólida (ELISA) (41).

Recientemente Jolly y col., reportaron varias regiones de VP4 capaces de unirse a la superficie de las células MA104, estas regiones fueron identificadas utilizando la técnica de despliegue en fagos; dentro de los fagos seleccionados, se encontraron tres que contienen una región entre los aminoácidos 650-657 la cual cae dentro de la secuencia del *péptido KID* (aa 642-659) (19).

Modelo de las primeras interacciones de rotavirus con su célula blanco.

El modelo de trabajo que se ha propuesto en el laboratorio a partir de los hallazgos mencionados se muestran en la figura 6. En este modelo el rotavirus RRV se une inicialmente, a un receptor que contiene ácido siálico a través de la proteína VP8. Proponemos que esta primera unión provoca en la proteína VP4 un cambio conformacional que le permite al virus interactuar subsecuentemente a la integrina $\alpha 2\beta 1$ a través del motivo DGE, presente en los aminoácidos 308 a 310 de VP5. Esta interacción podría facilitar las interacciones posteriores del virus con la integrina $\alpha v\beta 3$ y la proteína de choque térmico hsc70. La primera interacción estaría mediada por la proteína VP7, a través de la región *CNP*, en tanto que la región del

péptido *KID* de *VP5* está involucrada en la unión con *hsc70*. Estas interacciones probablemente sean importantes para inducir la penetración del virus al citoplasma celular.

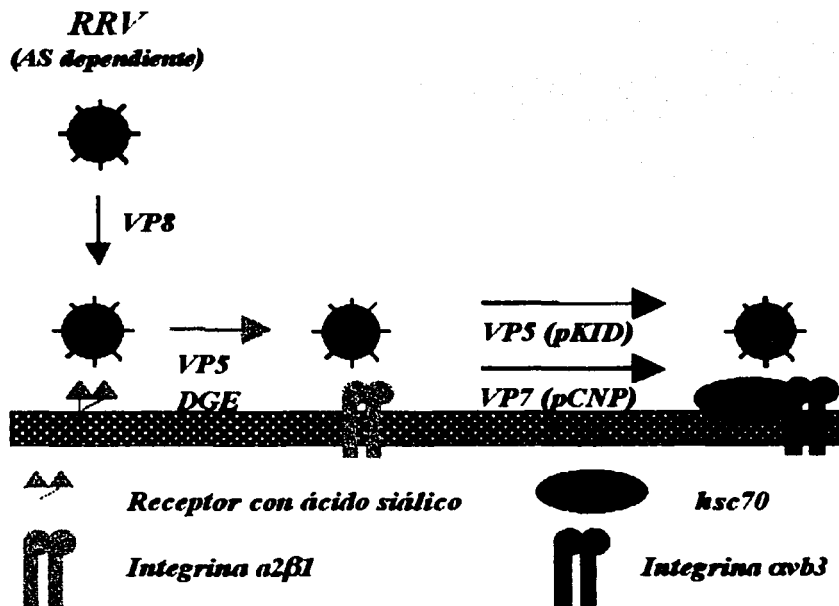


Fig. 6 Modelo de las primeras interacciones del rotavirus con su célula huésped.

Descripción del sistema de despliegue en fagos.

La técnica de despliegue en fagos originalmente propuesta por George Smith en 1985 (33), se basa en fusionar cualquier DNA extraño al gen de alguna de las proteínas de la cápside

del bacteriófago M13, con la finalidad de que se exprese en la superficie del mismo (15, 27, 34, 42).

El bacteriófago M13 es un virus que infecta cepas de *E. coli* que contengan el plásmido *F'*. Es un virus cilíndrico de 7 nm de diámetro por 2000 nm de largo que contiene un DNA de cadena sencilla covalentemente cerrado que codifica para 11 genes, cada uno de los cuales da lugar a un producto peptídico. Las proteínas I, IV y XI del fago están involucradas en el ensamblaje de la partícula, las proteínas II y X en la replicación del DNA, la proteína V une DNA de cadena sencilla, en tanto que las proteínas III, VI, VII, VIII y IX forman parte de la cápside de la partícula viral (3, 22).

Existen alrededor de 2700 copias de la proteína VIII en la cápside del fago. En la parte apical del mismo se localizan 5 moléculas tanto de la proteína VII como de la IX, por el contrario, en la parte basal existen 5 moléculas de la proteína III y VI (Fig. 7).

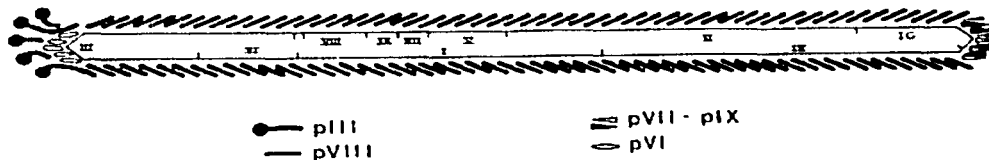


Fig. 7 Microscopía electrónica y representación esquemática del bacteriófago M13, en donde se muestran la localización de las proteínas de la cápside y la orientación del DNA (Tomada de Kay et al, 1996. (22))

El proceso de infección de M13 (Fig. 8) inicia con una interacción específica del fago a través de la proteína III (pIII) con el pili de la bacteria. La retracción del pili, (probablemente por la despolimerización de las subunidades de pilina al interior de la membrana interna) lleva al fago muy cerca de la superficie de la membrana. Posteriormente, la proteína pVIII se integra a la membrana interna, en un proceso denominado "integración", lo que ocasiona la translocación del DNA viral al citoplasma celular. En el citoplasma, las enzimas bacterianas sintetizan la hebra complementaria del DNA, convirtiéndola en un DNA de doble cadena superenrollado, que representa la forma replicativa del genoma viral (RF), la cual sirve como template para la transcripción. La producción de proteínas del fago incrementa con la acumulación de las moléculas RF. Las proteínas involucradas en la replicación del DNA permanecen en el citoplasma. La proteína pV tiene la capacidad de unir DNA de cadena sencilla, de tal manera que cuando alcanza concentraciones críticas, secuestra el genoma viral de cadena sencilla. El complejo pV-DNA no puede ser convertido en moléculas RF, pero sí puede ser ensamblado en nuevas partículas de fago. El ensamblaje ocurre en la envoltura de la

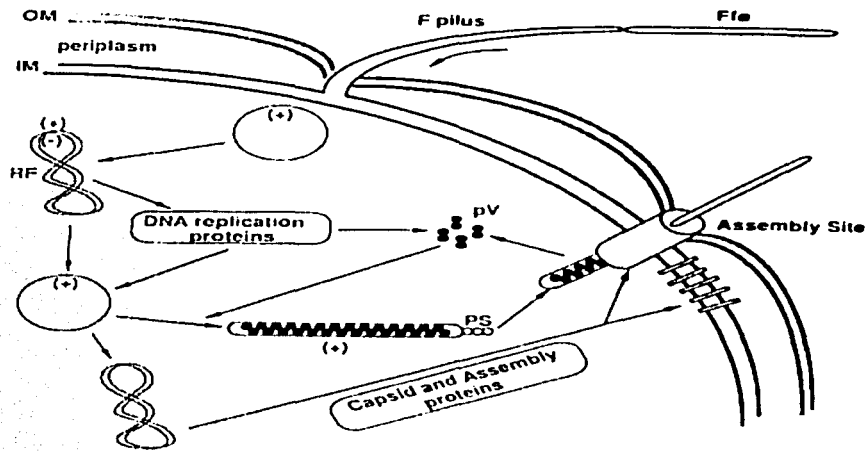


Fig. 8 Representación esquemática del ciclo replicativo del bacteriófago M13. OM: Membrana externa, Fφ: fago, IM: membrana interna, (+): DNA de cadena sencilla, (-) DNA complementario. RF: forma replicativa de doble cadena. PS: señal de empaquetamiento del bacteriófago, pV: proteína V. Tomado de Kay y col. 1996 [Kay, 1996 #918].

bacteria, en donde la membrana interna y externa están en contacto muy cercano. Durante este proceso, el complejo pV-DNA se separa y el DNA es desplazado, permitiendo con ello que las proteínas de la cápside, las cuales están presentes en la membrana interna de la bacteria, se ensamblen alrededor del mismo. El ensamblaje continúa hasta que todo el DNA se encuentra empaquetado y el fago se libera al medio (3, 22) (Ver figura 8).

Actualmente se ha desarrollado una cantidad muy amplia de vectores para despliegue en fagos (fagémidos). Los fagémidos son plásmidos que contienen un origen de replicación en *E. coli*, un sitio de inicio para la replicación y una señal de empaquetamiento del fago M13; por lo general los fagémidos contienen marcadores de resistencia a antibióticos, lo que permite seleccionarlos a través de los medios de cultivo apropiados. Con el propósito de desplegar péptidos o proteínas en la cápside del fago, los

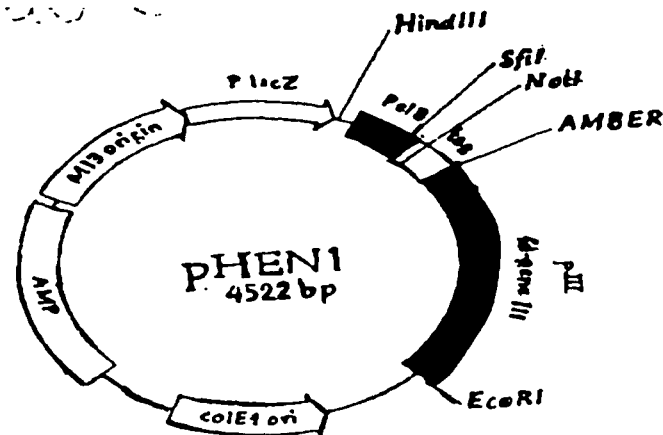


Fig. 9 Representación esquemática el fagémido pPHEN1
Tomado de Hoogenboom, 1991.

insertos clonados en el sitio múltiple de clonación del fagémido, se expresan como proteínas recombinantes fusionadas a la proteína pIII ó pVIII (según sea el caso) del bacteriófago M13 y a una etiqueta o "tag", la cual es reconocida por anticuerpos monoclonales, permitiendo de esta manera la inmunodetección de las proteínas recombinantes. Las proteínas recombinantes también están fusionadas a un péptido líder (*PeIB*), encargado de la exportación de estas proteínas al periplasma, lo que permite su purificación a partir de este compartimento

mediante un choque osmótico. En algunos casos, los fagémidos contienen un codón de terminación de la traducción (ambar) localizado entre la proteína de interés y la proteína pIII, con lo cual si estos fagémidos son transfectados en células supresoras del codón ambar, las proteínas recombinantes secretadas al periplasma estarán fusionadas a pIII, por el contrario si la cepa utilizada no es supresora del codón de terminación, únicamente se expresará la proteína de interés (ver figura 9) (15, 39).

Una vez clonado el fragmento deseado en el gen de la proteína pIII (*Fig. 10*), el fagémido se transforma en células de *E. coli*. Las células transformantes son infectadas con un fago "helper" o ayudador, el cual aporta todas las proteínas del bacteriófago, lo que permite que el fagémido se ensamble en partículas infecciosas, las cuales salen de la célula. Los fagos ayudadores por lo general tienen un origen de replicación o una señal de empaquetamiento defectuosas, lo que permite el empaquetamiento preferencial del genoma del fago, asegurando con ello que los fagos que son secretados al medio, en su mayoría contengan el péptido fusionado a la proteína pIII. La forma de selección de aquellas transformantes que han sido infectadas con el fago helper es a través de medios selectivos, ya que tanto el fagémido como el helper contienen genes de resistencia a antibióticos. Una vez que las transformantes han sido infectadas con el fago helper, se pueden purificar los fagos recombinantes y pueden ser titulados en ensayos en placa para emplearse posteriormente en los experimentos de interés (17).

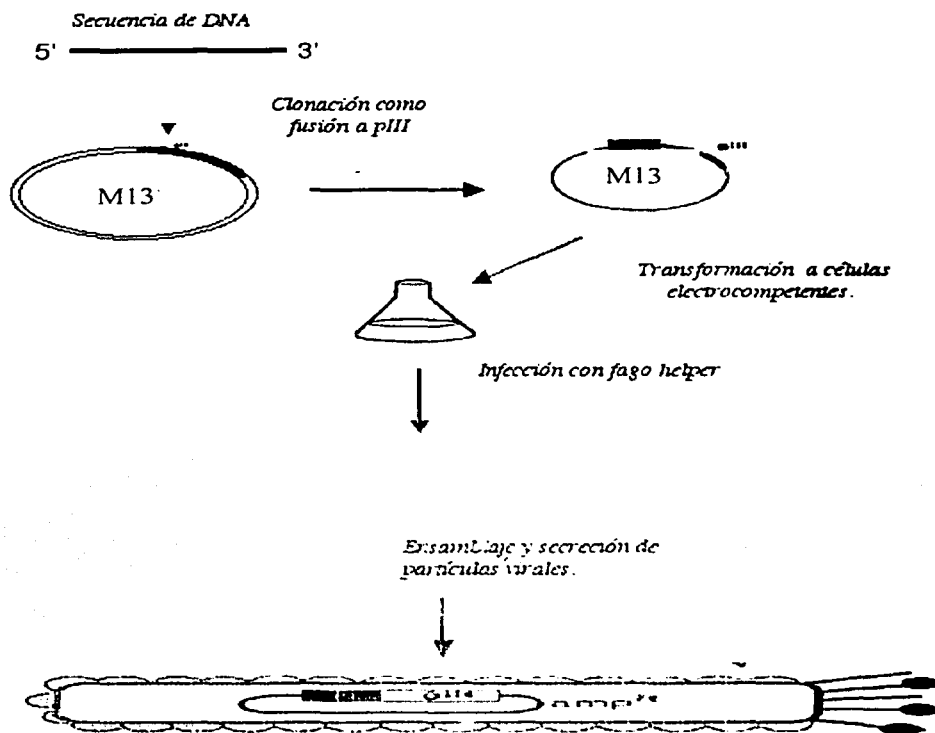


Fig. 10 Representación esquemática de la técnica de despliegue en fagos.

OBJETIVOS.

General

Determinar mediante la técnica de despliegue en fagos si las proteínas de superficie VP4 y VP7 de rotavirus se unen a la proteína de choque térmico hsc70 y a la integrina $\alpha\beta3$ respectivamente a través de los dominios *KID* y *CNP*.

Específicos.

1. Obtener los fagémidos con las construcciones de los péptidos *KID*, *CNP*, *VP4-30aa*, *VP4-50aa*, *VP7-30aa* y *VP7-50aa*.
2. Expresar las proteínas recombinantes a partir de las construcciones obtenidas en el objetivo 1.
3. Obtener fagos recombinantes que expresen como fusión a la proteína pIII las construcciones del objetivo 1.
4. Evaluar y determinar la especificidad de la unión de los fagos recombinantes con sus respectivos ligandos (hsc70 ó $\alpha\beta3$) en inmunoensayos en fase sólida (ELISA).
5. Determinar si los fagos recombinantes obtenidos bloquean la infección de rotavirus en células MA104 .

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.

Para cumplir con los objetivos de este trabajo, tomando en cuenta las evidencias preliminares que se habían generado en el laboratorio, se decidió clonar en el fagémido pHEN1 la secuencia correspondiente a la región de los péptidos *KID* (aa 642 a 658 de la proteína VP4) y *CNP* (aa 161 a 169 de la proteína VP7). Estas construcciones fueron denominadas *péptido KID (pKID)* y *CNP (pCNP)*. Para disminuir la posibilidad de que la conformación de estos péptidos en la proteína de fusión no fuera la correcta al ser desplegados en la superficie de los fagos, se decidió generar construcciones adicionales que contuvieran regiones de 30 y 50 aminoácidos de las proteínas VP4 ó VP7, pero que conservaran la secuencia de los péptidos *KID* ó *CNP* (según fuera el caso); en el caso de VP7, la región de 30 aminoácidos comprende los aa 151 a 180 (*VP7-30aa*), y la de 50 aminoácidos va de los aa 141 a 190 (*VP7-50aa*). Para VP4, se incluyen las regiones de los aminoácidos 636 a 665 (*VP4-30aa*) y de los aminoácidos 625 a 674 (*VP4-50aa*).

MATERIAL Y MÉTODOS.

1.- Obtención de fagémidos que contienen la secuencia de los péptidos KID, CNP y las regiones de 30 y 50 aminoácidos.

Las distintas construcciones de los péptidos y de las regiones de 30 y 50 aminoácidos, se obtuvieron clonando fragmentos de PCR amplificados de plásmidos que contenían los genes de las proteínas VP4 y VP7 del rotavirus RRV. A continuación se muestran en las tablas cada uno de los oligonucleótidos utilizados para dichas amplificaciones.

Para VP4:

Nombre del amplificado.	Tamaño del amplificado (# de aminoácidos)	Oligonucleótidos	Nombre del oligonucleótido.
Péptido KID	17	<u>AAA</u> CTG CAG AAG ACT AAA ATT GAT CG	<i>Pep5Pst/A</i>
		<u>AAA</u> CTG CAG ATC TGG TAA TGT GTT TGG	<i>Pep5Pst/B</i>
VP4-30 aa	30	<u>GCC.CCG.CTC</u> GAG ATA TCT GCT GCA GTA TTG	<i>Pep5Xho/3</i>
		<u>GCC.CCG.CTC</u> GAG CTC TGA AGC TTC AGT GAC	<i>Pep5Xho/4</i>
VP4-50 aa	50	<u>GCC.CCG.CTC</u> GAG GCT ACG CAA ACA GAA GG	<i>Pep5Xho/5</i>
		<u>GCC.CCG.CTC</u> GAG TCT GTA CGC TCT ATT AGG	<i>Pep5Xho/6</i>

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de las diferentes construcciones para VP4.

Para VP7:

Nombre del amplificado.	Tamaño del amplificado (# de aminoácidos)	Oligonucleótidos	Nombre del oligonucleótido.
CNP	9	<u>AAA</u> CTG CAG AAT GAA TGG CTG TGC	CNPPst/A
		<u>AAA</u> CTG CAG ATC CAT TGG ATT GCA C	CNPPst/B
VP7-30 aa	30	<u>AAA</u> CTG CAG GAC ATG TCT GAA CTA GC	VP7CNP/3
		<u>AAA</u> CTG CAG TTC GTC TGT TTG TTG ATA ATA	VP7CNP/4
VP7-50 aa	50	<u>AAA</u> CTG CAG GGA AGA TCC CAT AGA AAT C	VP7CNP/5
		<u>AAA</u> CTG CAG CTA ATG AAA TAT GAT GC	VP7CNP/6

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de las diferentes construcciones para VP7.

Todos los oligonucleótidos contienen en el extremo 5' el sitio de corte para *Pst* I (excepto los oligos para amplificar VP4 de 30 y 50 aminoácidos, que contienen la secuencia de corte para *Xho* I) (**negritas**), además de algunos nucleótidos adicionales que son irrelevantes, pero que mejoran la eficiencia de corte de la enzima (subrayados).

La reacción de PCR para cada construcción fue la siguiente:

Temperatura (°C)	Tiempo	# de Ciclos
94	5 min.	1
94	2 min.	25
42	1 min.	25
72	2min	25
72	2 min.	1

Tabla 3. Condiciones para las reacciones de PCR para amplificar los fragmentos de las diferentes construcciones.

Una vez obtenido el producto de PCR, se digirió con su respectiva enzima *PstI* ó *XhoI*, se extrajo con fenol - cloroformo y se ligó al vector pHEN1, el cual fue previamente digerido con la enzima correspondiente y desfosforilado con fosfatasa alcalina (*Boehringer*). El producto de la ligación se transformó por electroporación en células TG1 electrocompetentes (con una eficiencia de transformación mayor o igual a 1×10^{10} colonias/ μg DNA), las células se plaquearon en cajas Petri con medio LB /ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), se incubaron a 37° C toda la noche.

2.- Caracterización de las células transformantes.

Los fagémidos recombinantes se analizaron por PCR y por secuenciación, para seleccionar aquellas transformantes que tuviesen los insertos correctos, tanto en tamaño como en orientación. La presencia y orientación correcta del inserto se caracterizó por PCR (*Fig. 11*). La amplificación se realizó utilizando un oligonucleótido que hibrida con el vector pHEN1 (en dirección 5'→3' en relación al mRNA de la proteína pIII, y un segundo que hibrida con el inserto en la dirección 3'→5'. Si el fragmento estaba clonado en la dirección correcta (5'→3'), al utilizar este par de oligos entonces se obtendría un producto de tamaño conocido (A), por el contrario, si el fragmento estaba clonado en la dirección incorrecta (3'→5'), no se obtendría ningún producto (B) pues ambos oligonucleótidos hibridarían en el mismo sentido 5'→3'.

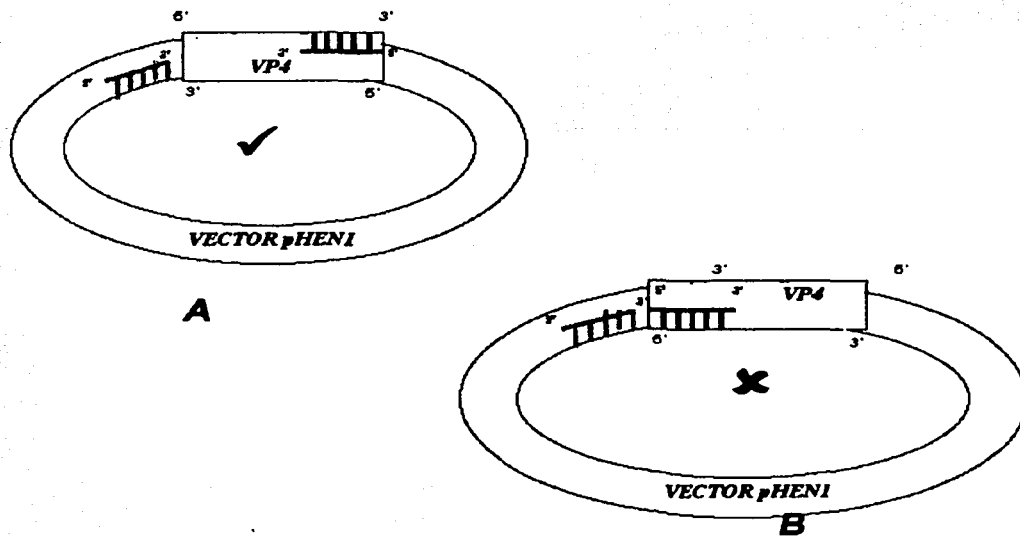


Fig 11. Representación esquemática de la caracterización por PCR de las clonas transformantes.

Para corroborar la identidad de los productos amplificados por PCR, éstos se digirieron con la misma enzima con que fue clonado (*Pst*I ó *Xho*I) y se analizó el patrón de digestión en un gel de acrilamida al 15%. Aquellos fagémidos cuyo inserto clonado tenía la orientación correcta, y el tamaño esperado, fueron secuenciados en la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología, utilizando un oligonucleótido del vector llamado LMB3 (5'CAG GAA ACA GCT ATG AC 3'). El oligonucleótido LMB3 hibrida en el extremo 5' de una región cercana al péptido *PeIB* del vector pHEN1, amplificando este péptido, el sitio múltiple de clonación y la región correspondiente a la proteína III del fago (para mayor referencia ver figura 9).

3.- Inducción con IPTG de la expresión de las bacterias transformantes.

Las bacterias que contienen los fagémidos recombinantes, se crecieron en medio 2x YT glucosa 2%/ ampicilina (100 µg/ml), hasta una $OD_{600} = 0.7$ y se indujeron con 1mM de *Isopropil-tio-β-D-galactósido* (IPTG) en presencia de 1mM de PMSF; el control de no inducción se trató solamente con 1mM PMSF. Después de una incubación a 37 °C a 300 rpm por 6 horas (post-inducción) se tomó una muestra de las muestras inducidas y del control. Se midió la densidad óptica de cada muestra, ajustando los volúmenes para tener una misma densidad en todos los cultivos. Las muestras se centrifugaron a 13.000 rpm por 5 minutos en una centrifuga Ependorf y se resuspendieron en 500 µl de PBS (Buffer de fosfatos: solución salina 0.8%, NaCl 0.02%, KCl 0.115%, Na_2HPO_4 0.024%, KH_2PO_4 a pH 7.4)/PMSF 1mM. La mitad de este volumen fue lisado por sonicación, el resto se empleó para extraer las proteínas del periplasma.

4.- Extracción de proteínas de periplasma por choque osmótico.

Las bacterias inducidas (250 µl) se centrifugaron a 5000 rpm por 15 minutos, el sedimento se resuspendió en 1/10 del volumen inicial, en buffer PPB (200 mg/ml sacarosa, 1mM EDTA, 30 mM Tris-HCl pH 8) y se incubó en hielo por 20 minutos. Posteriormente, las muestras se centrifugaron nuevamente a 5000 rpm por 15 minutos para recuperar el sobrenadante, el cual contiene las proteínas extraídas de periplasma.

5.- Inmunoblot de las proteínas recombinantes.

Las proteínas totales y periplásmicas de las bacterias que contenían los fagémidos recombinantes después de haberse inducido con IPTG, se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 11%. El gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (*Millipore*) para

realizar el inmunoblot. Para esto, la membrana se bloqueó 1 h a temperatura ambiente con solución de bloqueo (PBS 1x, Tween 0.2%, leche 5%). La expresión de las proteínas recombinantes clonadas como fusión a pIII se detectó mediante un tag de *c-myc* que se encuentra en el extremo amino de la proteína pIII, utilizando un anticuerpo primario anti *c-myc* de ratón (*Clona 9E10 Zymed*) a una dilución de 1:500; el anticuerpo secundario fue un anti IgG de ratón acoplado a peroxidasa, diluido 1:2,500 (*KPL*); la membrana se reveló con luminol (*Perkin Elmer*).

En el caso de las construcciones que contenían los péptidos derivados de VP4, las proteínas recombinantes expresadas como fusión a pIII, se detectaron también mediante un anticuerpo policlonal dirigido contra los aminoácidos 474 a 776 de la proteína VP5 ($\alpha VP5_{474-776}$) (preparado por la Dra. Minerva Camacho Nuez en el laboratorio), el cual se utilizó a una dilución 1:3,000; el anticuerpo secundario fue un anticonejo acoplado a peroxidasa (*KPL*) diluido 1:5,000. La membrana se reveló con luminol (*Perkin Elmer*).

6.- Obtención y purificación de fagos recombinantes.

Para obtener los fagos recombinantes, 10 ml de medio 2x YT amp (100 $\mu\text{g/ml}$), glucosa 2%, se inocularon con 15 μl del cultivo que contiene las transformantes con los fagémidos recombinantes, se incubó toda la noche a 37 °C en agitación a 300 rpm. 5 ml de este cultivo crecido toda la noche se utilizó para incubar 50 ml de medio 2x YT/amp/glu el cual se incubó a 37°C con agitación a 300 rpm, hasta obtener una $\text{OD}_{600} = 0.7$. Posteriormente se agregaron 100 μl de fago helper M13K07 (*New England Biolabs*) con un título de 1×10^{11} ufp/ml y el cultivo se incubó a 37°C por 30 minutos sin agitación, cambiándolo después a 37°C y 300 rpm por 30 minutos. El cultivo se centrifugó a 4000 xg por 10 minutos, a 4°C y el sedimento se resuspendió en 50 ml de medio 2x YT ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$)/kanamicina (45 $\mu\text{g/ml}$) y se incubó por 30 minutos a 37°C con agitación para después cambiarlo a 30°C con agitación toda

la noche. Finalmente el medio se centrifugó a 4000 xg a 4°C por 20 minutos. Los fagos presentes en el sobrenadante, se recuperaron precipitando con 1/10 del volumen con PEG 20% (PEG 20%/ 2.5 M NaCl) en hielo por 15 minutos y colectándolos a 4000 xg por 20 minutos a 4°C. El sobrenadante de esta centrifugación se incubó nuevamente en hielo por 15 minutos y se centrifugó en las mismas condiciones descritas. Los fagos presentes en el sedimento se resuspendieron en 1ml de PBS 1x y se centrifugaron a 4000 xg por 10 minutos, el sobrenadante se filtró a través de un filtro de 0.45 µm. Los fagos recuperados se titularon como a continuación se describe.

7.- Titulación de fagos.

Células TG1 se crecieron en medio 2x YT glu 2%, hasta una $OD_{600} = 0.7$, posteriormente 1 ml de éstas células TG1 se infectaron a 37°C por 30 minutos con diluciones conocidas de los fagos. Un décimo del volumen de esta infección se plaqueó en cajas Petri con medio sólido 2x YT amp /kan y se incubó toda la noche a 37°C. Para conocer el título de los fagos, se contaron las colonias obtenidas y se multiplicó este número por el factor de dilución y por el volumen plaqueado. El título se expresa en unidades formadoras de placa por mililitro (ufp/ml).

8. Evaluación de la unión de los fagos recombinantes a sus respectivos ligandos por inmunoensayos en placa (ELISA).

Para los fagos de VP4.

Placas de ELISA de 96 pozos con fondo en "U" (*Costar*) se sensibilizaron con 500 ng por pozo de la proteína purificada hsc70 durante 2 h a 37°C. Posteriormente la placa se bloqueó con BSA 1% a 37°C por 2 h y luego, se agregaron diluciones conocidas de los fagos por duplicado. Estos se incubaron a 37°C por 2 h. Los fagos unidos a la placa se detectaron con un

anticuerpo anti-M13 acoplado a peroxidasa a una dilución 1:2,500 (*Pharmacia Biotech*); incubándose a 37°C por 1.5 horas. Se reveló con buffer de citratos y orto-fenil diamina (OPD) como sustrato y la reacción se paró con 1N H₂SO₄. La placa se leyó a una $\lambda = 490$ nm.

Para los fagos de VP7:

Placas de ELISA de 96 pozos con fondo en "U" (*Costar*) fueron sensibilizadas con 100 ng por pozo de la integrina $\alpha v \beta 3$ (*Chemicon*) a 4°C por toda la noche; la placa se bloqueó con leche 1%/PBS 1x por 2 h a 37°C; se agregaron por duplicado diluciones conocidas de fagos por 2 h a 37°C. Los fagos de VP7 unidos a la placa de ELISA, se detectaron como se describe para los fagos de VP4.

9.- Ensayos de competencia de los fagos de VP4 y VP7 contra los péptidos KID y CNP respectivamente.

Placas de 96 pozos (*Costar*) fueron sensibilizadas con 500 ng por pozo de la proteína hsc70, ó con 100 ng por pozo de la integrina $\alpha v \beta 3$, incubando toda la noche a 4°C. Las placas se bloquearon con BSA 1% por 2 h a 37°C y posteriormente se agregaron 50 μ l del péptido KID (para los ensayos con los fagos de VP4) o del péptido CNP (para los ensayos con los fagos de VP7) en cantidades crecientes, desde 12.5 hasta 200 μ g por pozo y se incubaron a 37°C por 2 h. Como control negativo se agregaron los péptidos *scr-KID* y *scr-CNP* que contienen los mismos aminoácidos que los péptidos KID y CNP respectivamente, pero su secuencia es distinta. Posteriormente, se agregaron cantidades constantes de los fagos en presencia de cantidades crecientes de los péptidos y se dejaron incubar a 37°C por 2 h. Los fagos que se unieron a la placa se detectaron como se describe en la sección anterior.

10.- Ensayo de bloqueo de la infectividad de rotavirus en células MA104.

Células MA104 (células epiteliales de riñón de mono) crecidas en placas de 96 pozos, con medio mínimo esencial de Eagle (MEM) (*Gibco/BRL*), suplementado con 10% de suero fetal bovino, a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂, hasta obtener una monocapa confluyente. Fueron incubadas con diluciones conocidas de los fagos recombinantes por 90 minutos a 37°C, posteriormente se retiró el medio y se agregaron 200 unidades formadoras de focos del virus RRV por pozo, en medio MEM frío, las células se incubaron por 45 minutos a 4°C y se lavaron con PBS. Posteriormente se agregó medio MEM a los pozos y la placa se incubó a 37°C por 14 horas. Para detectar las células infectadas, la monocapa se fijó agregando 100 µl/pozo de acetona al 80% diluida en PBS, por 15 minutos a temperatura ambiente y se lavaron dos veces con PBS. Posteriormente se agregaron 50 µl/pozo de un suero policlonal antirotavirus hecho en conejo (αYM, a una dilución 1: 500) y se incubaron las células a 37°C por 1 h. Las células se lavaron con PBS y se agregaron 50 µl/pozo de proteína A acoplada a peroxidasa, a una dilución 1: 2500. Después de incubar por 1 h a 37°C, las células se lavaron con PBS y finalmente se agregó el sustrato para peroxidasa (buffer de citratos 1x, carbazole y H₂O₂), las células se dejaron teñir por 5 minutos y se enjuagaron con agua bidestilada. El número de células infectadas se cuantificaron al microscopio empleando un sistema semiautomático Visolab (12). La inhibición de la infectividad se expresa como el porcentaje de células infectadas obtenido en presencia del fago, en relación al número de células infectadas presentes en los pozos controles a los cuales no se les agregaron los fagos recombinantes.

RESULTADOS.

1. *Obtención de fagémidos que expresan los péptidos de VP4 y VP7 fusionados a la proteína pIII del fago M13.*

Con la finalidad de obtener fagémidos recombinantes que expresen los péptidos *KID* (de la proteína VP4) y *CNP* (de la proteína VP7) de manera estable y en una conformación adecuada (similar o igual a la que tendrían en el contexto de la partícula de rotavirus), se clonaron en el fagémido pHEN1, como fusión a la proteína III (pIII) del fago M13 y al tag de c-myc, regiones de tamaño variable de VP4 y VP7 (9, 30 y 50 aa para VP7 y 17, 30 y 50 aa para VP4). Los fragmentos clonados se obtuvieron por PCR. Para determinar si los fragmentos clonados tenían la orientación y el tamaño correctos, las construcciones obtenidas se analizaron por PCR (como se menciona en materiales y métodos); si el fragmento estaba clonado en la dirección correcta, se obtendría un producto de PCR de tamaño conocido; por el contrario, si el fragmento estaba clonado en la dirección incorrecta, entonces no se obtendría ningún producto, de tal manera que la presencia de un amplificado asegura la fidelidad de la clonación. En la figura 12 se muestra como ejemplo, la caracterización y el análisis de restricción de los productos de PCR de las construcciones que contienen las secuencias de los péptidos *KID* y *CNP*. El producto de PCR esperado para el péptido *KID* tiene un tamaño de 168 pb (carril 8) y su digestión con la enzima *PstI* genera dos fragmentos, uno de 117 y otro de 51 pb (carriles 5, 6 y 7). En el caso de la construcción con el péptido *CNP*, el tamaño del producto de PCR esperado es de 138 pb (carril 4), mientras que su digestión con *PstI* genera un fragmento de 117 y otro de 21 pb (carriles 2 y 3). Como control se amplificó una región de 266 pb del vector pHEN1 (carril 10), cuya digestión con *PstI* genera un fragmento de 149 pb y otro de 117 pb (carril 9).

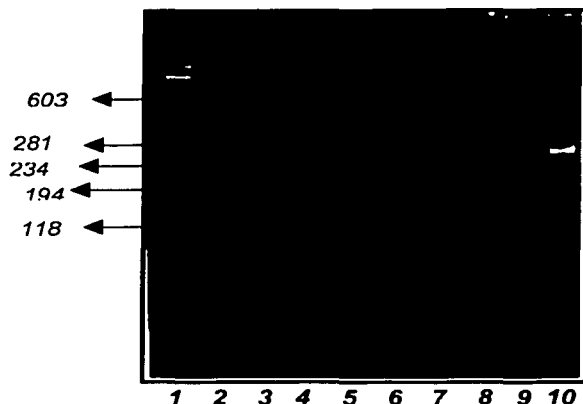


Fig. 12 Caracterización por PCR y digestión enzimática de los productos de las clonas transformantes de pKID y pCNP. Carriles: 1) Marcador de peso molecular; 2 y 3) pCNP/Pst I; 4) pCNP; 5, 6 y 7) pKID/Pst I; 8) pKID; 9) pHENI/Pst I; 10) pHENI. Gel de acrilamida al 15%.

Para determinar que los insertos clonados estaban en el marco de lectura correcto, las construcciones cuyos insertos clonados tenían el tamaño y la orientación correcta, se secuenciaron utilizando el oligonucleótido LMB3 del vector pHENI. A partir de los fagémidos recombinantes obtenidos se obtuvo cuando menos una clona con la secuencia en el marco de lectura correcto para cada una de las seis construcciones realizadas, estas clonas se utilizaron para su posterior caracterización, así como para la obtención de los fagos recombinantes, en la siguiente tabla se muestra la secuencia de aminoácidos de las regiones clonadas en el fagémido.

Construcción	Aminoácidos	Secuencia
(1) pKID	642-658	KTKIDRSTQISPNTLPD
(2) VP4-30aa	636-665	ISAAVLKTKIDRSTQISPNTLPDIVTEASE
(3) VP4-50aa	151-180	ATQTEGMNFDDISAAVLKTKIDRSTQISPNTLPDIVTEASEKFIPNRAYR
(4) pCNP	161-169	NVWTCNPMID
(5) VP7-30aa	625-674	DMSELADLILNFWTCNPMIDTLYYYQQTDE
(6) VP7-50aa	141-190	LMKYDATLQLDMSSELADLILNFWTCNPMIDTLYYYQQTDEANKWISMIGSS

Tabla 4. Secuencia de aminoácidos de las regiones clonadas en el fagémido pHENI.

2. Detección de la expresión de las proteínas recombinantes.

Con la finalidad de comprobar la funcionalidad de las construcciones obtenidas, se indujo la expresión de las proteínas recombinantes fusionadas a pIII y a c-myc. Como controles positivos se utilizaron el vector pHEN1 sin inserto, el cual codifica por la proteína pIII, y un fagémido que contiene la región variable de un anticuerpo contra una toxina de alacrán (*4EScFv*). La detección de la expresión de las proteínas de fusión presentes tanto en el lisado total de las bacterias recombinantes, como en el periplasma celular, se realizó por inmunoblot, utilizando un anticuerpo contra c-myc. La síntesis de las proteínas recombinantes a partir de los fagémidos se indujo añadiendo IPTG a los cultivos bacterianos. En el caso de las construcciones *VP4-50aa* y *VP7-30aa* no se pudo observar ninguna proteína que se indujera con IPTG (estos resultados no se muestran). Por el contrario, la inducción de las proteínas correspondientes a las construcciones *pKID*, *VP4-30aa*, *pCNP* y *VP7-50aa* se observaron claramente (ver adelante).

En la figura 13 se presenta el inmunoblot de las proteínas recombinantes *pKID*, *VP4-30aa*, *pCNP*, *VP7-50aa* y el vector pHEN1 presentes en un lisado total, detectadas con el anticuerpo anti c-myc. En todas las muestras se reconoce una proteína de aproximadamente 50 kDa, que es la banda más enriquecida; en las muestras de las proteínas recombinantes *VP4-30aa* y *VP7-50aa* (carriles 3 y 5, respectivamente) se reconocen además, dos bandas con pesos moleculares aproximados de 55 y 60 kDa. Existe otra banda de aproximadamente 40 kDa que está presente en todas las muestras incluyendo en el control negativo (carril 1), por lo cual se considera ruido de fondo del propio anticuerpo.

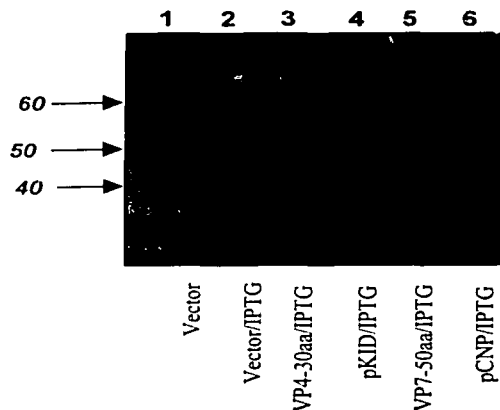


Fig 13. Análisis por inmunoblot de las proteínas totales bacterianas obtenidas por lisis celular, utilizando el anticuerpo anti c-myc. Gel de poliacrilamida al 11%. Carriles: 1) *pHEN1 SIN inducir*; 2) *pHEN1/IPTG*; 3) *VP4-30aa/IPTG*; 4) *pKID/IPTG*; 5) *VP7-50aa/IPTG*; 6) *pCNP/IPTG*. Los pesos moleculares se indican con las flechas adyacentes a la figura expresados en kDa.

La figura 14 representa el inmunoblot de las proteínas recombinantes *VP4-30aa*, *pKID*, *VP7-50aa* y *pCNP* obtenidas por extracción del periplasma de un cultivo bacteriano inducido con IPTG. En todas las muestras, se reconocieron tres bandas con pesos moleculares aproximados de 50, 55 y 60 kDa, dentro de las cuales la banda de 60 kDa es la más abundante. No se detectó ninguna señal en las muestras del vector *pHEN1* sin inducir e inducido, por lo cual esos carriles no se presentan en el inmunoblot.

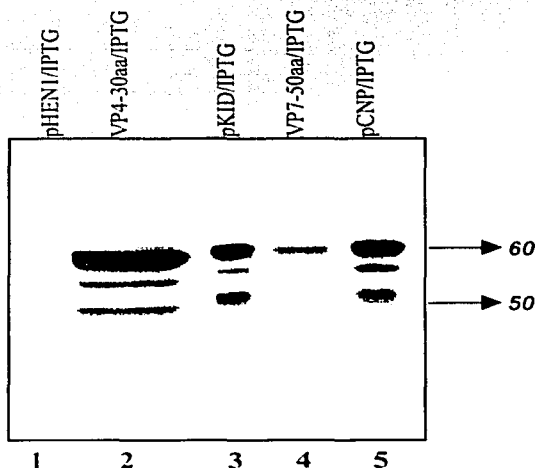


Fig 14. Análisis por inmunoblot de las proteínas recombinantes obtenidas de periplasma, utilizando el anticuerpo anti c-myc. Gel de poliacrilamida al 11%. Carriles: 1) *pHEN1/IPTG*; 2) *VP4-30aa/IPTG*; 3) *pKID/IPTG*; 4) *VP7-50aa/IPTG*; 5) *pCNP/IPTG*. Los pesos moleculares se indican con las flechas adyacentes a la figura expresados en kDa.

A continuación se presenta una tabla que contiene los pesos moleculares observados en los inmunoblots que se muestran en las figuras 13 y 14, y los pesos moleculares calculados según la composición de aminoácidos de cada proteína recombinante:

<i>Proteína recombinante</i>	<i>Peso molecular kDa esperado</i>	<i>Peso molecular kDa observado en lisis Fig.13</i>	<i>Peso molecular kDa observado en periplasma Fig.14</i>
<i>VP4-30aa</i>	49	50,55,60	50, 55, 60
<i>pKID</i>	48	50	50,55, 60
<i>VP7-50aa</i>	52	50,55,60.	50, 55, 60
<i>pCNP</i>	47	50	50,55, 60
<i>pIII (control)</i>	42	50	No se detectó.

Tabla 5. Pesos moleculares esperados y observados de las proteínas recombinantes.

La migración de las bandas reconocidas en las muestras de las proteínas recombinantes del lisado total y del periplasma fue muy similar. Por lo tanto, para corroborar que las bandas detectadas correspondieran a la expresión de las proteínas recombinantes, y no solamente a la expresión de la proteína pIII y al tag de c-myc, se analizaron las proteínas por inmunoblot con un anticuerpo policlonal dirigido contra los aminoácidos 474 a 776 de la proteína VP5 (α VP5₄₇₄₋₇₇₆), para evaluar la expresión de las proteínas recombinantes *VP4-30aa* y *pKID*. La figura 15 representa el resultado de este ensayo empleando proteínas totales. En las bacterias que portan el vector pHEN1 no se detectó ninguna señal en las muestras inducidas y sin inducir (carriles 1 y 2). Por el contrario, en las proteínas derivadas de las bacterias que contienen los fagémidos *VP4-30aa* y *pKID* se detectó una banda de 50 kDa (carriles 3 y 5); el carril 4 corresponde a una muestra de rotavirus activado con tripsina en donde se reconoce una banda de 60 kDa que corresponde a la proteína VP5.

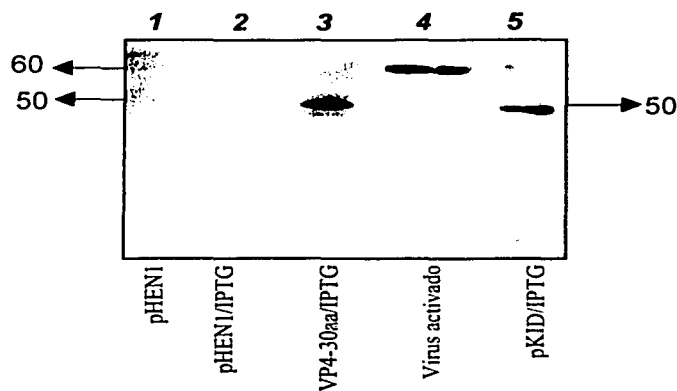


Fig 15. Immunotinción de las proteínas recombinantes VP4-30aa y pKID obtenidas por lisis celular, utilizando el anticuerpo $\alpha VP5_{474-776}$. Gel de poliacrilamida al 11%. Carriles: 1) pHEN1, 2) pHEN1/IPTG, 3) VP4-30aa/IPTG, 4) virus activado; 5) pKID/IPTG. Los pesos moleculares se indican con las flechas adyacentes a la figura expresados en kDa.

En base a estos resultados se puede decir que las bandas detectadas en los ensayos de inmunoblot utilizando los anticuerpos anti c-myc y $\alpha VP5_{474-776}$, efectivamente corresponden a la expresión de los péptidos de VP4 fusionados a la proteína III de M13 y a la etiqueta de c-myc. En el caso de los fagémidos VP7-50aa y pCNP esto no se pudo evaluar por carecer de un anticuerpo que reconociera el péptido CNP.

3. Obtención de los fagos recombinantes.

Los fagémidos construidos se utilizaron para generar fagos recombinantes, (ver la metodología), los cuales debieran desplegar en su superficie la proteína pIII fusionada a los péptidos de VP4 y VP7. Estos fagos se nombraron en base a la proteína que estuviesen desplegando: fKID, fVP4-30aa, fCNP, fVP7-50aa y f4EScFv.

4. Determinación de la especificidad de los fagos recombinantes a sus respectivos ligandos (hsc70 ó $\alpha\beta3$).

Para identificar si los fagos recombinantes que despliegan las construcciones de VP4 y de VP7 se unen a la proteína de choque térmico hsc70 y a la integrina $\alpha\beta3$, respectivamente, se realizaron ensayos de unión a las proteínas hsc70 o a la integrina $\alpha\beta3$ respectivamente, en un formato de ELISA. Los títulos de los fagos utilizados en estos ensayos oscilaron entre 1×10^{10} y 2×10^{11} ufp/ml. En las secciones 4.1 y 4.2 se describen los ensayos de unión que se realizaron para los fagos de VP4 y VP7, respectivamente.

4.1 Unión de los fagos recombinantes *fKID* y *fVP4-30aa* a la proteína de choque térmico hsc70.

Los ensayos de unión para determinar la especificidad de los fagos de VP4 consistieron en sensibilizar una placa de ELISA con la proteína hsc70, a la cual se agregaron por duplicado desde 10^7 hasta 10^{10} fagos por pozo de los fagos recombinantes *fKID* y *fVP4-30aa* y como controles negativos los fagos de *fCNP*, *fVP7-50aa* y *f4EScFv*, en las mismas cantidades. En la figura 16 se muestra el resultado de dos ensayos en los que se grafica el promedio (con sus respectivas desviaciones estándar), de estos ensayos de unión; los datos se presentan como la absorbancia obtenida a 490 nm contra la cantidad de fagos por pozo.

Unión de los fagos *fKID* y *fVP4-30aa* a la proteína de choque térmico *hsc70*.

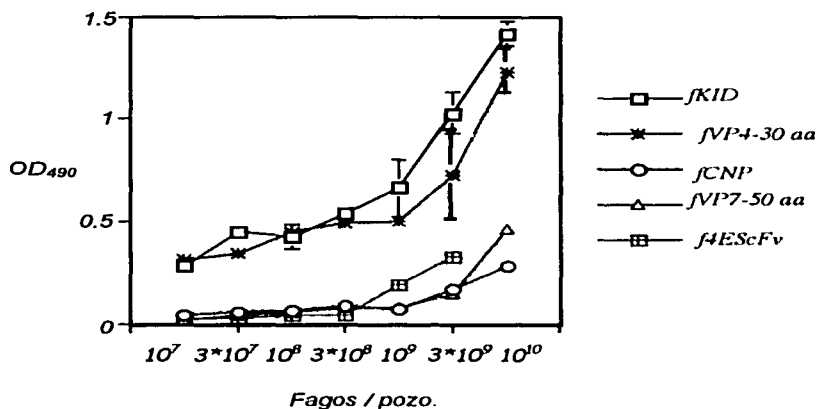


Fig.16 Unión de los fagos *fKID* y *fVP4-30aa* a la proteína de choque térmico *hsc70* en placa de ELISA. Los datos se presentan como la absorbancia obtenida a 490 nm contra la cantidad de fagos por pozo. Se grafica la media aritmética y su respectiva desviación estándar de dos ensayos independientes.

En la gráfica se puede observar que la unión de los fagos recombinantes *fKID* y *fVP4-30aa* a la proteína *hsc70* es dependiente de la concentración, en tanto que los fagos recombinantes *fCNP*, *fVP7-50aa* y *f4EScFv* que se utilizaron como controles, no se unen a la proteína *hsc70* o lo hacen mucho menos que los fagos que contienen las secuencias de VP4. Además, es claro que no existen diferencias entre la unión de los fagos recombinantes *fKID* y *fVP4-30aa* a la proteína *hsc70*.

4.2 Unión de los fagos recombinantes *fCNP* y *fVP7-50aa* a la integrina $\alpha\beta3$.

Para los ensayos de unión de los fagos recombinantes *fCNP* y *fVP7-50aa* a la integrina $\alpha\beta3$, se sensibilizó una placa de ELISA con 100 ng por pozo de esta integrina obtenida comercialmente, para añadir posteriormente desde 10^7 hasta 3×10^9 fagos por pozo. Como controles negativos se utilizaron los fagos recombinantes *fKID*, *fVP4-30aa* y *f4EScFv* en las mismas cantidades. A continuación se presenta la gráfica del promedio de dos ensayos independientes con sus respectivas desviaciones estándar, los datos se representan como la absorbancia obtenida a 490 nm contra los fagos añadidos.

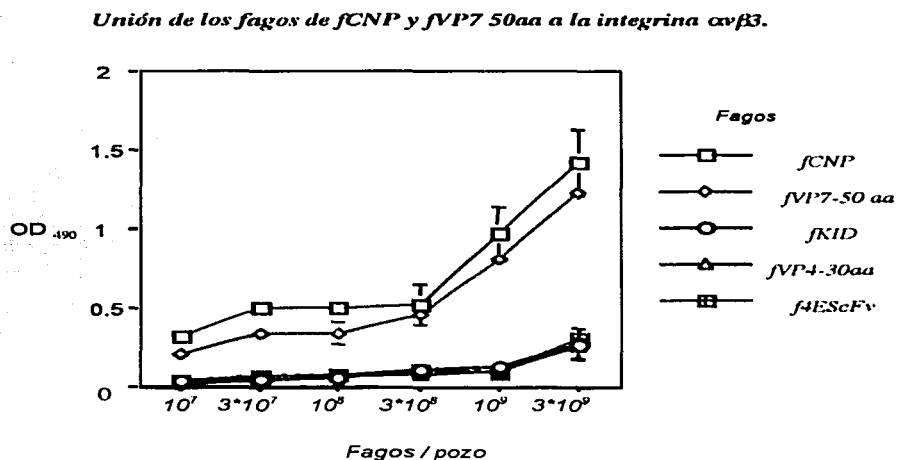


Fig. 17 Unión de los fagos *fCNP* y *fVP7-50aa* a la integrina $\alpha\beta3$ en placa de ELISA. Los datos se presentan como la absorbancia obtenida a 490 nm contra la cantidad de fagos por pozo. Se grafica la media aritmética y sus respectivas desviaciones estándar de dos ensayos independientes.

Al igual que los resultados obtenidos en la unión de los fagos de VP4 a hsc70, en la figura 17 se puede observar que los fagos recombinantes de *fCNP* y *fVP7-50aa* se unen de

manera específica a la integrina $\alpha\beta 3$, en tanto que los fagos *fKID*, *fVP4-30aa* y *f4EScFv* no lo hacen. No parece existir diferencia entre la unión de los fagos recombinantes *fCNP* y *fVP7-50aa* a $\alpha\beta 3$.

5. Competencia de la unión de los fagos recombinantes contra los péptidos *KID* y *CNP*.

Para determinar si la unión de los fagos recombinantes de VP4 y VP7 a la proteína de choque térmico hsc70 y a la integrina $\alpha\beta 3$, respectivamente, era específica, se realizaron ensayos de competencia por la unión a sus ligandos, utilizando los péptidos sintéticos *KID* y *CNP*. Como control negativo se utilizaron péptidos que contienen la misma composición de aminoácidos que los péptidos *KID* y *CNP*, pero en un orden distinto: péptidos "scramble". A continuación en las secciones 5.1 y 5.2, se presentan las gráficas correspondientes para dichos ensayos.

5.1 Unión de los fagos recombinantes *fKID* y *fVP4-30aa* a la proteína de choque térmico hsc70 en presencia de los péptidos sintéticos *KID* y *scr-KID*.

Se realizaron tres ensayos independientes por duplicado para evaluar si los péptidos *KID* y *scr-KID* competían la unión de los fagos recombinantes *fKID* y *fVP4-30aa* a la proteína de choque térmico hsc70. Los ensayos se realizaron como se describe en la metodología. Se sensibilizó una placa de ELISA con la proteína hsc70 y se agregaron cantidades crecientes del péptido *KID* o su control *scr-KID*. Posteriormente, se agregaron cantidades constantes de los fagos (las cuales fueron determinadas mediante ensayos de unión de los fagos a sus respectivos ligandos, conociendo así la densidad óptica aproximada de una cantidad específica de fagos) en presencia de cantidades crecientes de los péptidos. Los fagos que se unieron a la placa, se detectaron con un anticuerpo anti-M13. En las figuras 18 y 19, se muestra el promedio de

estos ensayos. Los datos se presentan como el porcentaje de fagos unidos a la placa contra la cantidad de péptido añadido por pozo.

Competencia de los péptidos KID y scr-KID por la unión de los fagos recombinantes fKID a la proteína de choque térmico hsc70.

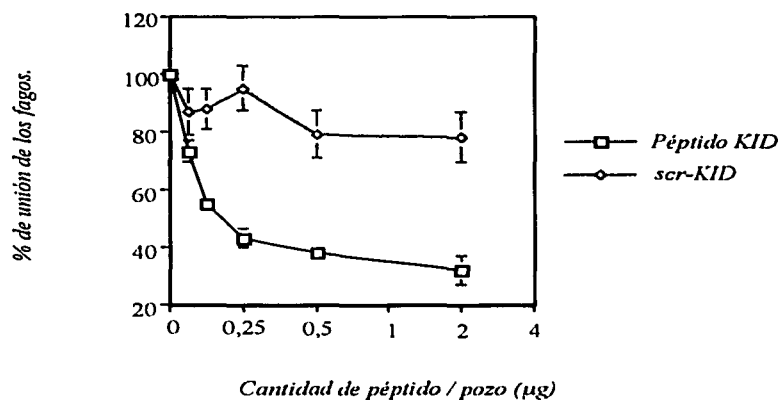


Fig.18 Competencia de los péptidos KID y scr-KID por la unión de los fagos recombinantes fKID a la proteína de choque térmico hsc70 en placa de ELISA. Los datos se presentan como el porcentaje de unión de los fagos contra la cantidad de péptido presente por pozo. Se grafican por lo menos el promedio de tres ensayos independientes.

Competencia de los péptidos KID y scr-KID por la unión de los fagos recombinantes fKID a la proteína de choque térmico hsc70.

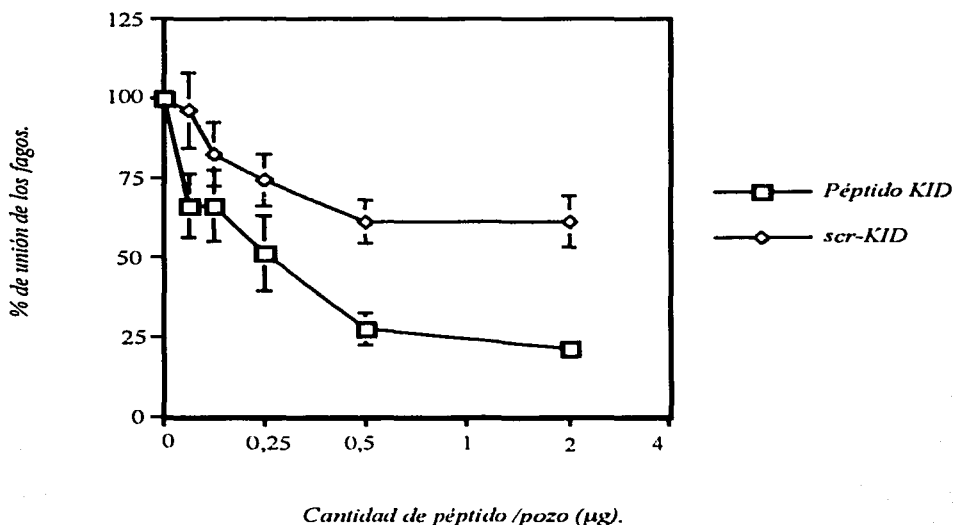


Fig.19 Competencia de los péptidos KID y scr-KID por la unión de los fagos recombinantes VP4-30aa a la proteína de choque térmico hsc70 en placa de ELISA. Se grafica el promedio del porcentaje de unión de los fagos contra la cantidad de péptido presente por pozo de tres ensayos independientes.

Los resultados obtenidos en los ensayos de competencia entre los fagos recombinantes KID y VP4-30aa y los péptidos KID y scr-KID por la unión a hsc70, revelaron que el péptido KID es capaz de bloquear la unión de los fagos de VP4 a la proteína de choque térmico hsc70. Este

evento depende de la cantidad de péptido añadido por pozo. Por otro lado, el péptido *scr-KID* afecta la unión de ambos fagos a la proteína hsc70, sin embargo esta inhibición es menor que la causada por *pKID*; tal evento puede deberse a un impedimento estérico del péptido *scr-KID* cuando se encuentra en concentraciones altas (100 ó 200 μg por pozo) y no a la unión específica del péptido *scr-KID* a la proteína de choque térmico. Además, cuando se compiten los fagos recombinantes contra cantidades menores del péptido *KID* (12.5 ó 0 μg) por la unión a hsc70, el efecto de bloqueo que se observa es mínimo, lo cual nos sugiere que la cantidad requerida del péptido para competir con los fagos, debe ser por lo menos, mayor a 12.5 μg por pozo.

5.2 Unión de los fagos recombinantes *fCNP* y *fVP7-50aa* a la integrina $\alpha\beta3$ en presencia de los péptidos sintéticos *CNP* y *scr-CNP*.

Para determinar la especificidad de la unión de los fagos recombinantes de VP7 a la integrina $\alpha\beta3$, se realizaron tres ensayos independientes por duplicado para competir la unión a la integrina $\alpha\beta3$ de los fagos recombinantes *fCNP* y *fVP7-50aa* con los péptidos *CNP* y *scr-CNP*. Los ensayos se llevaron a cabo como se describe en la metodología, utilizando esta integrina para sensibilizar una placa de ELISA a la cual se le agregaron cantidades crecientes del péptido *CNP* o su control *scr-CNP*. Posteriormente se agregaron cantidades constantes de los fagos (estas cantidades, se determinaron mediante ensayos de unión de los fagos recombinantes a sus respectivos ligandos, lo que permitió determinar la densidad óptica de una cantidad constante de fagos) recombinantes de VP7 en presencia del péptido *CNP*, los fagos que se unieron a la placa se detectaron con un anticuerpo anti-M13. En las figuras 20 y 21, se muestran los resultados obtenidos en estos ensayos. Los datos se presentan como la media aritmética, y sus respectivas desviaciones estándar, de la absorbancia a 490 nm, contra la cantidad de péptido añadido por pozo.

Competencia de los fagos recombinantes fCNP y los péptidos CNP y scr-CNP por la unión a la integrina $\alpha\beta 3$.

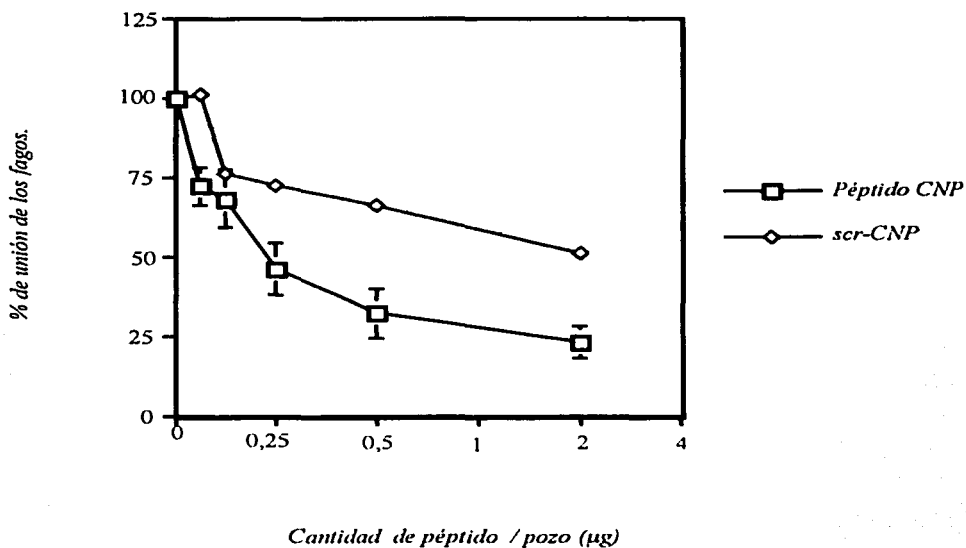


Fig.20 Competencia entre los fagos recombinantes fCNP y los péptidos CNP y scr-CNP por la unión a la integrina $\alpha\beta 3$ en placa de ELISA. Se grafica el promedio de tres experimentos independientes, los datos se presentan como el porcentaje de unión de los fagos a la placa contra la cantidad de péptido presente por pozo.

Competencia de los fagos recombinantes fVP7-50aa y los péptidos CNP y scr-CNP por la unión a la integrina $\alpha\beta3$.

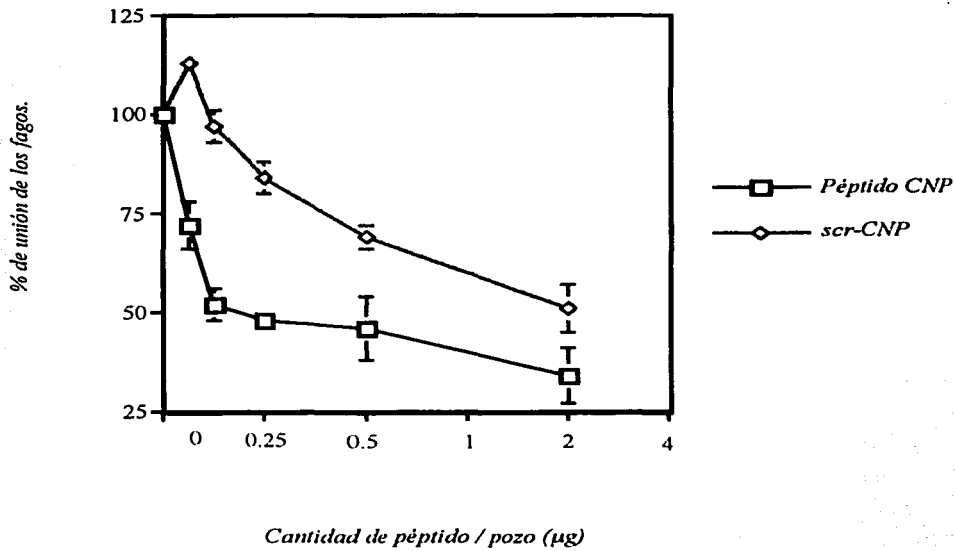


Fig.21 Competencia entre los fagos recombinantes fVP7-50aa y los péptidos CNP y scr-CNP por la unión a la integrina $\alpha\beta3$ en placa de ELISA. Se grafica el promedio de tres ensayos independientes. Los datos se presentan como el porcentaje de fagos unidos a la placa contra la cantidad de péptido presente en cada pozo.

Al igual que en los resultados obtenidos de la competencia de los fagos recombinantes de VP4, en este caso se puede observar en las figuras 20 y 21 que el péptido *CNP* bloquea la unión de los fagos recombinantes *fCNP* y *fVP7-50aa* a la integrina $\alpha v \beta 3$. Este bloqueo depende de la cantidad de péptido; pues en las cantidades menores empleadas (12.5 ó 0 μg) el bloqueo es mínimo o nulo. Además, se observó que el péptido *scr-CNP* bloquea la unión de los fagos recombinantes de VP7 a la integrina $\alpha v \beta 3$, en un evento dependiente de la cantidad de péptido presente en el pozo. Cabe destacar que el bloqueo del péptido *scr-CNP* es menor al que presenta el *pCNP*, por lo que probablemente se deba a una diferencia en la afinidad de ambos péptidos por la integrina $\alpha v \beta 3$, probablemente causado por la cantidad en masa del péptido *scr-CNP* o bien que la afinidad del péptido a la integrina no dependa de la secuencia, si no que sea afectada por factores tales como la disposición de las cargas entre otros, aunque dicho evento no es posible explicarlo de manera clara.

6. Bloqueo de la infectividad de rotavirus en células MA104.

Basándonos en los resultados obtenidos en los ensayos de unión de los fagos recombinantes a sus respectivos ligandos, se realizaron ensayos para determinar si los fagos bloqueaban la infectividad de rotavirus en células MA104. Sin embargo, en ninguno de los ensayos realizados se observaron diferencias significativas que comprobaran el efecto de bloqueo de los fagos en la infección de rotavirus. Así, concluimos que los fagos recombinantes a pesar de que sí se unen a sus ligandos en los ensayos de ELISA, no son capaces de bloquear la infección por rotavirus en células en cultivo.

DISCUSIÓN.

Basándonos en las evidencias hasta ahora obtenidas en el laboratorio, el propósito de este trabajo consistió en determinar mediante la técnica de despliegue en fagos si las proteínas de superficie VP4 y VP7 de rotavirus se unen a la proteína de choque térmico hsc70 y a la integrina $\alpha\beta 3$, respectivamente a través de los dominios *KID* y *CNP*. Para ello se clonaron en el fagémido pHEN1 regiones de tamaño variable de VP4 y VP7 como fusiones a la proteína III del fago M13. Los fagémidos recombinantes se caracterizaron por PCR (ver figura 12) y por secuenciación para seleccionar aquellos cuyos insertos tuviesen el tamaño y la orientación correcta. Se obtuvo por lo menos una clona con la secuencia correcta para cada una de las construcciones deseadas.

Para comprobar la funcionalidad de estas construcciones, se indujo la expresión de las proteínas recombinantes, la cuales se detectaron por inmunoblot. El análisis de las proteínas *VP4-30aa*, *pKID*, *VP7-50aa* y *pCNP* presentes en un lisado total, detectadas con un anticuerpo anti c-myc, reveló que en todas las muestras se reconoce una proteína de aproximadamente 50 kDa, la cual es la banda más abundante. Se pudieron detectar también otras bandas de 55 y 60 kDa, cuya intensidad es claramente menor a la de 50 kDa, y las cuales aparecen solamente en las muestras de las proteínas *VP4-30aa* y *VP7-50aa*. En el caso de las proteínas recombinantes obtenidas de periplasma, se reconocieron tres bandas de 50, 55 y 60 kDa, siendo esta última la banda más abundante. La diferencia entre las intensidades de las bandas detectadas en las muestras obtenidas de un lisado total, comparadas con las del periplasma, sugiere que la banda de 50 kDa detectada mayoritariamente en el lisado total es producto de degradación proteolítica de la banda de 60 kDa que se detectó con mayor intensidad en el periplasma. La exportación a este compartimento de la proteína recombinante pudiera protegerla de la degradación por las proteasas presentes en el citoplasma.

El análisis de las proteínas recombinantes por inmunoblot, mostró que existen diferencias claras entre los pesos moleculares calculados para cada construcción y los que se observaron en los geles. Aunque no podemos explicar con certeza la causa de las diferencias en los pesos moleculares calculados y observados, ciertamente la migración anómala de la proteína pIII del fago M13 ha sido reportada con anterioridad (17, 28, 37), ya que a pesar de que esta proteína tiene un peso molecular de 42 kDa, migra alrededor de los 55 a 70 kDa. A pesar de que la migración intrínseca de la proteína pIII ha sido reportada, no se ha dado ninguna explicación de tal comportamiento. Es probable que la fuerza de las interacciones presentes en la conformación tridimensional de la molécula evite que la proteína se desnaturalice completamente durante el tratamiento con SDS y calor, o que se recupere parte de su estructura durante la migración en el gel de poliacrilamida y ocasione la consecuente migración anómala de la proteína. La migración anómala de esta proteína apoya la idea de que la proteína de 60 kDa, detectada en todas las muestras, corresponde a las proteínas recombinantes fusionadas a la proteína pIII.

Debido a que la migración electroforética de las diferentes proteínas recombinantes fue similar, se realizó un ensayo de inmunoblot con un anticuerpo específico para comprobar que las bandas detectadas correspondían únicamente a las secuencias virales fusionadas a pIII y no al resultado de la expresión de la proteína *pIII-c-myc*. Para ello se analizaron las proteínas recombinantes *VP4-30aa* y *pKID*, las cuales fueron detectadas con el anticuerpo $\alpha VP5$ ⁴⁷⁴⁻⁷⁷⁶ (ver metodología). Los resultados de este ensayo revelaron que las bandas detectadas para estos dos fagémidos efectivamente correspondían a la expresión de las proteínas recombinantes *VP4-30aa-pIII* y *pKID-pIII*. En el caso de las fagémidos recombinantes *VP7-50aa* y *pCNP*, esto no se pudo evaluar por carecer de un anticuerpo que reconociera al péptido *CNP*.

Una vez que se evaluó la expresión de las proteínas recombinantes, se generaron fagos recombinantes a partir de estos fagémidos. Con la finalidad de detectar las proteínas de rotavirus fusionadas a la proteína III de la cápside del fago, se realizaron ensayos de inmunoblot

de cada uno de los fagos recombinantes, utilizando un anticuerpo anti M-13; sin embargo, no se detectó ninguna banda. Aunque estos ensayos han sido realizados con anterioridad (28, 37), el título de los fagos utilizados ha sido mucho mayor (10^{12} ó 10^{13} ufp/ml) a los títulos obtenidos en este trabajo. Este punto es determinante ya que sólo existen cinco moléculas de pIII por fago y de éstas sólo algunas desplegarán las fusiones.

Aunque las proteínas recombinantes desplegadas en los fagos no se pudieron detectar por inmunoblots se evaluó la unión de los fagos a sus respectivos ligandos mediante inmunoensayos en fase sólida (ELISA). Estos ensayos nos permitieron determinar de manera conclusiva que los fagos despliegan las proteínas recombinantes en su superficie y que éstas son capaces de unirse de manera específica a sus respectivos ligandos. Como se muestra en las figuras 16 y 17, los fagos recombinantes *fKID* y *fVP4-30aa* se unieron a la proteína de choque térmico hsc70, al igual que los fagos recombinantes *fCNP* y *fVP7-50aa* reconocieron a la integrina $\alpha\beta3$. En ambos casos se demostró que la unión es dependiente de la cantidad de fagos por pozo. Además, mediante ensayos de competencia (ver figuras 18 a 21) utilizando los péptidos sintéticos *KID* y *CNP* se demostró que la unión de los fagos recombinantes de VP4 y VP7 a sus respectivos ligandos es específica, ya que estos bloquearon selectivamente la unión de los fagos de VP4 a la proteína hsc70 y de VP7 la integrina $\alpha\beta3$.

Se evaluó si la conformación de los péptidos y de las construcciones de 30 y 50 aa era la correcta al ser desplegados en la superficie de los fagos, mediante ensayos de unión a sus respectivos ligandos. Se determinó que no existen diferencias entre la unión de los fagos recombinantes que despliegan sólo la región correspondiente a los péptidos (*fCNP* y *fKID*) respecto a los fagos que contienen regiones más grandes (*fVP4-30aa* y *fVP7-50aa*). Cabe mencionar que en el caso de los fagémidos recombinantes que contenían las construcciones para *pVP4-50aa* y *pVP7-30aa* no se observó ninguna proteína recombinante, lo cual de manera indirecta sugiere la posibilidad de que la secuencia propia de estas construcciones ocasione que las proteínas de fusión sean más lábiles o inestables, y por lo tanto más susceptibles de ser

degradadas por proteasas, impidiendo su detección por inmunoblots. Por otro lado, la unión específica de los fagos recombinantes a sus respectivos ligandos, nos confirma que los fagos efectivamente están desplegando de una manera estable y adecuada conformacionalmente las proteínas recombinantes fusionadas a pIII.

Los resultados obtenidos a partir de los ensayos de unión y de competencia de los fagos recombinantes sugieren que la proteína VP4 de rotavirus se une a hsc70 a través de una región denominada *KID* que comprende los aminoácidos 642 a 658 de VP4, en tanto que la proteína VP7 se une a la integrina $\alpha\beta3$ mediante la región *CNP* (aminoácidos 161 a 169). Estos resultados constituyen evidencias directas que apoyan los datos obtenidos recientemente en nuestro laboratorio (13, 40) los cuales de manera resumida son:

1. La mitad carboxilo terminal de la proteína VP5 expresada en *E. coli* bloquea la infectividad de los rotavirus RRV y nar3 (41).
2. El péptido *KID* es capaz de bloquear la infectividad de los rotavirus RRV y nar3 (41).
3. Anticuerpos monoclonales contra la proteína hsc70 y la proteína misma, son capaces de bloquear la infectividad de los virus RRV y nar3 cuando estos anticuerpos se preincuban con las células antes de la infección (12).
4. Partículas virales que contienen las tres capas de proteínas (TLP's) y no DLP's se unen a la proteína hsc70 en un ensayo de ELISA y esta unión se compite con la mitad carboxilo terminal de VP5 y con el péptido *KID* (40).
5. El péptido *CNP* se une directamente a la integrina $\alpha\beta3$ en ensayos de ELISA y compite la unión de los rotavirus RRV y nar3 (40).
6. El péptido *CNP* es capaz de bloquear la infectividad de los virus RRV y nar3 (41).

Tomando en cuenta las observaciones anteriores, realizamos ensayos de bloqueo de la infectividad de rotavirus en células MA104 con los fagos. Sin embargo, ninguno de estos fagos inhibieron de manera significativa la infección del rotavirus RRV en células MA104. A pesar

de que los resultados obtenidos en los ensayos de unión en placa de ELISA, muestran evidencias directas de la unión específica de los fagos recombinantes a sus ligandos purificados. Es posible que los sitios de unión en los ligandos respectivos para los fagos (hsc70 ó $\alpha\beta 3$) no estén fácilmente accesibles en la superficie de la célula, impidiendo la unión a estos y por lo tanto no se observa ningún efecto en la infección viral. Por otro lado, no se puede descartar que los fagos sí interaccionen con sus ligandos en la superficie de la célula, pero que en el contexto de las primeras interacciones del virus con la célula, éste sea capaz de desplazar a los fagos ya unidos. Como ya se ha mencionado, se sabe que tanto el péptido *KID* como el *CNP* son capaces de bloquear la infección por rotavirus en células MA104, en el caso de los fagos recombinantes obtenidos en este trabajo, se observó que no tienen el mismo efecto, probablemente porque la cantidad en masa de los péptidos expresados como fusión a pIII (los cuales son desplegados en la superficie del fago), es menor comparada con la cantidad de péptido que se añade en los ensayos de bloqueo. En el caso específico de los fagos, posiblemente éstos puedan ser capaces de unirse a sus ligandos, pero no son capaces de bloquear todas o la mayoría de las moléculas receptoras para rotavirus (en este caso hsc70 ó $\alpha\beta 3$), permitiendo de esta forma que se desarrolle una infección viral.

Independientemente de que los fagos recombinantes no fueron capaces de bloquear la infectividad de los rotavirus, los resultados obtenidos en este trabajo proporcionan evidencias directas sobre la unión de la proteína VP4, a través de la región comprendida entre los aminoácidos 642 a 658 (*KID*), a la proteína de choque térmico hsc70, y de la unión de la proteína VP7 a la integrina $\alpha\beta 3$, mediante la región denominada *CNP* (aa 161 a 169).

Además, los fagos generados proporcionan una herramienta que permite (mediante el uso de mutagénesis dirigida), delimitar los aminoácidos responsables y necesarios para la unión de dichas proteínas a los receptores celulares. Por otro lado, ofrece la posibilidad para que mediante mutagénesis al azar y subsecuentes rondas de selección ("*biopannings*"), se obtengan fagos con mayor grado de afinidad por los receptores y utilizarlos en ensayos de bloqueo de la

infección para determinar de manera más clara cuál es el papel de las interacciones VP4-hsc70 y VP7- α v β 3 durante el proceso de entrada de los rotavirus a su célula blanco. Finalmente, el uso de la técnica de despliegue en fagos para la creación de bibliotecas al azar de los genes VP4 y VP7, permitirán seleccionar de entre una colección de secuencias, aquellas que sean más afines por las células, lo que proporcionaría información acerca de si existen dominios no identificados hasta ahora en las proteínas de superficie de rotavirus que estén implicadas en las primeras interacciones del virus con su célula huésped.

BIBLIOGRAFÍA.

1. **Arias, C. F., Carlos A. Guerrero, Ernesto Méndez, Selene Zárate, Pavel Isa, Rafaela Espinosa, Pedro Romero & Susana López.** 2001. Early events of rotavirus infection: the search for receptor(s)., p. 323, Gastroenteritis Viruses. John Wiley & Sons, USA.
2. **Arias, C. F., P. Romero, V. Álvarez, and S. López** 1996. Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity. *J. Virol.* **70**:5832-5839.
3. **Barbas III, C. F., Dennis R. Burton, Jamie K. Scott & Gregg J. Silverman.** 2001. Phage Display, A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press., New York, USA.
4. **Bergelson, J. M., Michael P. Shepley, Bosco M. C. Cahn, Martin E. Helmer & Robert W. Finberg.** 1992. Identification of the integrin VLA-2 as a receptor for echovirus 1. *Science.* **255**:1718-1720.
5. **Coulson, B. S., S. L. Londrigan, and D. J. Lee** 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**:5389-94.
6. **Espejo, R., S. López, and C. F. Arias** 1981. Structural polypeptides of simian rotavirus SA11 and the effect of trypsin. *J. Virol.* **37**:156-160.
7. **Estes, M. K., and C. J.** 1989. Rotavirus gen structure and function *Microbiol. Rev.* **53**:410-449.
8. **Evander, M., Ian H Frazer, Elizabeth Payne, Ying Mei Qi, Kylie Hengst & Nigel A. McMillan.** 1997. Identification of the $\alpha 6$ integrin as a candidate receptors for papillomaviruses. *Journal of virology.* **71**:2449-2456.
9. **Fuentes-Panama, E. M., S. López, M. Gorziglia, and C. F. Arias** 1995. Mapping the hemagglutination domain of rotaviruses. *J. Virol.* **69**:2629-2632.
10. **Gavrilovskaya, M., N. Irina, R. Shaw, M. Ginnsberg, and E. R. Mackow** 1998. Beta 3 integrins mediate the cellular entry of hantaviruses that cause respiratory failure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**:7074-7079.
11. **Guerrero, C. A., Daniela Bouyssounade, Selene Zárate, Pavel Isa, Tomás López, Rafaela Espinosa, Pedro Romero, Ernesto Méndez, Susana López & Carlos Arias.** 2002. Heat shock cognate protein 70 is involved in Rotavirus Cell Entry. *Journal of Virology.* **76**:4096-4102.
12. **Guerrero, C. A., E. Méndez, S. Zárate, P. Isa, S. López, and C. F. Arias** 2000b. Integrin mediates rotavirus cell entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**:14644-14649.

13. **Guerrero, C. A., S. Zárate, G. Corkidi, S. López, and C. F. Arias** 2000a. Biochemical characterization of rotavirus receptors in MA104 cells. *J. Virol.* **74**:9362-9371.
14. **Hewish, M. J., Y. Takada, and B. S. Coulson** 2000. Integrins $\alpha_2\beta_1$ and $\alpha_4\beta_1$ can mediate SA11 rotavirus attachment and entry into cells. *J. Virol.* **74**:228-236.
15. **Hoogenboom, H. R., Andrew D. Griffiths, Kevin S. Johnson, David J. Chiswell, Peter Hudson & Greg Winter.** 1991. Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acids Res.* **19**:4133-4137.
16. **Isa, P., S. López, L. Segovia, and C. F. Arias** 1997. Functional and structural analysis of the sialic acid-binding domain rotaviruses. *J. Virol.* **71**:6749-6756.
17. **Jackson, R. H., McCafferty, J., Johnson, K. S., Pope, A. R., Roberts, A. J., Chiswell, D. J., Clackson, T. P., Griffiths, A. D., Hoogenboom, H. R. & Winter, G.** 1992. Selection of variants of antibodies and other protein molecules using display on the surface of bacteriophage fd. *In* A. R. S. Rees, M. J. E.; Wetzell, P. (ed.), *Protein Engineering: A practical approach.* IRL Press., Oxford.
18. **Jackson, T., Amit Sharma, Robin Abu Ghazaleh, Wendy E. Blakemore, Fiona M. Ellard, David L. Simons, John Wineman, David I. Stuart & Andrew M. Q King.** 1997. Arginine-Glycine-Aspartic Acid-Specific Binding by Foot-and-Mouth Disease Viruses to the Purified Integrin $\alpha v\beta 3$ in vitro. *Journal of Virology.* **71**:8357-8361.
19. **Jolly, C. L., Jin-An Huang, Ian H. Holmes** 2001. Selection of rotavirus VP4 cell receptor binding for MA104 cells using a phage display library. *Journal of Virological Methods.* **98**:41-51.
20. **Kaljot, K. T., Shaw, R. D., Rubin, D. H. & Greenberg, H. B.** 1988. Infectious rotavirus enters cells by direct cell membrane penetration, not by endocytosis *J. Virol.* **62**:1136-44.
21. **Katyal, R., Rana, S. V & Singh, K.** 2000. Rotavirus infections *Acta Virological.* **44**:238-288.
22. **Kay, B. K., Jill Winter & John McCafferty** 1996. *Phage display of peptides and proteins. A laboratory manual.* Academic Press., USA.
23. **López, S., C. F. Arias, J. R. Bell, J. H. Strauss, and R. T. Espejo** 1985. Primary structure of the cleavage site associated with trypsin enhancement of rotavirus SA11 infectivity. *Virology.* **144**:11-19.
24. **López, S., I. López, P. Romero, E. Méndez, X. Soberón, and C. F. Arias** 1991. Rotavirus YM gene 4: analysis of its deduced amino acid sequence and prediction of the secondary structure of the VP4 protein. *J. Virol.* **65**:3738-3745.
25. **López, S. A., C.** 2001. Los rotavirus., p. 429. *In* J. Martínez E. & Martínez (ed.), *Microbios en línea.* DGSCA/UNAM, México.

26. **Mackow, E. R., Shaw, R.D., Matsui, S.M., Vo, P.T., Dang, M.N. & Greenberg, H.B.** 1988. The rhesus rotavirus gene encoding protein VP3: location of amino acids involved in homologous and heterologous rotavirus neutralization and identification of a putative fusion region. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **85**:645-9.
27. **Makowski, L.** 1994. Phage display: structure, assembly and engineering of filamentous bacteriophage M13. *Current Opinion in Structural Biology.* **4**:225-230.
28. **Marzari, R., Paolo Edomi, Raj K. Bhatnagar, Suhail Ahmad, Anganuthu Selvapandiyan & Andrew Bradbury.** 1997. Phage display of *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin. *FEBS Letters.* **411**:27-31.
29. **Méndez, E., C. F. Arias, and S. López** 1996. Interactions between the two surface proteins of rotavirus may alter the receptor-binding specificity of the virus. *J. Virol.* **70**:1218-22.
30. **Patton, J. T., J. Hua ^ E. A. Mansell.** 1993. Location of intrachain disulfide bonds in the VP5* and VP8* trypsin cleavage fragments of the rhesus rotavirus spike protein VP4. *Journal of Virology.* **67**:4848-4855.
31. **Pulli, T., Erkki koivunen & Timo Hyypia.** 1997. Cell- surface interactions of echovirus 22. *Journal of biological Chemistry.* **272**:21176-21180.
32. **Roivainen, M. L. P., Tapani Hovi, Ismo Virtanen, Terhi Riikonen, Jyrki Heino & Timo Hyypia.** 1994. Entry of Coxsackievirus A9 into Host Cells: Specific Interactions with alpha v beta 3 integrin, the vitronectin receptor. *Virology.* **203**:357-365.
33. **Smith, G. P.** 1985. Filamentous Fusion Phage : novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science.* **228**:1315-1317.
34. **Smith, G. P.** 1991. Surface presentation of protein epitopes using bacteriophage expression systems. *Current Opinion in Biotechnology.* **2**:668-673.
35. **Tihova, M., Kelly A. Dryden, A. Richard Bellamy, Harry B. Greenberg & Mark Yeager.** 2001. Localization of Membrane Permeabilization and Receptor Binding Sites on the VP4 Hemagglutinin of Rotavirus : Implications for Cell Entry. *Journal of Molecular Biology.* **314**:985-992.
36. **Wickham, T. J., P. Mathias, D. A. Cheresh and G.R. Nemerow.** 1993. Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell.* **73**:309-319.
37. **Wirsching, F., Thomas Optitz, Rüdiger Dietrich & Andreas Schwienhorst.** 1997. Display of functional thrombin inhibitor hirudin on the surface of phage M13. *Gene.* **204**:177-184.
38. **Wu, E., J. Fernández, S. K. Fleck, D. J. Von Seggern, S. Huang, and G. R. Nemerow** 2001. A 50-kDa Membrane Protein Mediates Sialic Acid-Independent Binding and Infection of Conjunctival Cells by Adenovirus Type 37. *Virol.* **279**:78-89.
39. **Zacher III, A., N., Carolyn A. Stock, James W. Golden II & George P. Smith** 1980. A new filamentous phage cloning vector: fd-tet. *Gene.* **9**:127-140.

40. **Zárate, S.** 2002. Caracterización de los dominios funcionales de la proteína VP4 de los rotavirus. Doctorado. Instituto de Biotecnología. U. N. A. M.
41. **Zárate, S., R. Espinosa, P. Romero, E. Méndez, C. F. Arias, and S. López** 2000. The VP5 domain of VP4 can mediate attachment of rotaviruses to cells. *J. Virol.* **74**:593-599.
42. **Zwick, M., B.; Juqun Shen & Jamie K. Scott.** 1998. Phage-displayed peptide libraries. *Current Opinion in Biotechnology.* **9**:427-436.