

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE LAS
PROTEÍNAS NSP1 Y NSP3 DE ROTAVIRUS

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A :
KEILI VIDAL ZAPATA

DIRECTOR DE TESIS: DR. LUIS PADILLA NORIEGA

MÉXICO, D. F.



NOVIEMBRE, 2004

COORDINACIÓN

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 13 de septiembre del 2004, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del(a) alumno(a) Vidal Zapata Keili, con número de cuenta 96585328 con la tesis titulada: "Estudio de la interacción de las proteínas NSP1 y NSP3 rotavirus", bajo la dirección del(a) Dr. Luis Padilla Noriega.

Presidente:	Dra. Beatriz Gómez García
Vocal:	Dra. Marisa Mazari Hiriart
Secretario:	Dr. Luis Padilla Noriega
Suplente:	Dra. Imelda López Villaseñor
Suplente:	Dr. Horacio Reyes Vivas

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a, 3 de noviembre del 2004


Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

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

- 33371-N del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)
- IN 222402 del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación Científica y Tecnológica (PAPIIT) de la Universidad Nacional Autónoma de México

Durante el desarrollo de la tesis se contó con apoyo financiero de los Programas de becas CONACyT y de la Dirección General de Estudios de Posgrado (UNAM).

☞ El proyecto contó con el apoyo de los miembros del Comité Tutorial:

Dra. Imelda López Villaseñor

Dra. Angelina Quintero Ruiz

Dr. Luis Padilla Noriega

☞ En el presente trabajo se contó con el apoyo técnico de la Maestra en Ciencias Carolina Piña Vázquez

A Ti que eres alfa y omega

Agradezco a

A mi Padre, pues nada en la vida tendría sentido si no estas conmigo

A cada miembro de mi familia. Su alma se
ha ensanchado tanto para poderme aceptar
y amar, que parece que les han salido alas.

A mis tíos y primos. El mejor regalo
que se le puede hacer a una solitaria
es una familia como ustedes.

A Judith, Gracias por tu apoyo incondicional.

A Claudio, Sergio y Carolina ustedes forman parte de mi familia

Al Dr. Padilla que me enseñado ante todo a
dudar

A mi comité tutorial: Dra. Imelda Lopez Villaseñor,
Dr. Luis Padilla Noriega y Dr. Angelina Quintero,
por su consejo y dirección

A Carlos, por lo que eres y serás.

Ubi dubium ibi libertas: Donde hay duda hay libertad.

Proverbio latino

"Las teorías son redes; sólo quien las echa pesca"

Novalis

"El conocimiento no consiste en una serie de teorías autoconsistentes que tienden a converger en una perspectiva ideal; no consiste en un acercamiento gradual hacia la verdad. Por el contrario, el conocimiento es un océano, siempre en aumento, de alternativas incompatibles entre sí. Toda teoría particular, todo cuento de hadas, todo mito, forman parte del conjunto que obliga al resto a una articulación mayor, y todos ellos contribuyen, por medio de este proceso competitivo, al desarrollo de nuestro conocimiento".

Feyerabend

Tabla de contenido

I. RESUMEN.....	1
II. INTRODUCCIÓN.....	3
III. OBJETIVOS.....	4
IV. ANTECEDENTES.....	5
1. Clasificación.....	6
2. Estructura del virus.....	6
3. Patogénesis.....	8
4. Epidemiología.....	8
5. Ciclo de replicación viral.....	10
6. ARN y proteínas virales.....	12
7. Proteína no estructural NSP3.....	15
7.1 Papel de NSP3 en la síntesis de proteínas celulares.....	16
7.2 Papel de NSP3 en la replicación del genoma.....	18
8. Proteína no estructural NSP1.....	19
9. Antecedentes de una posible interacción de NSP1 y NSP3	22
V. METODOLOGIA.....	24
Producción del virus.....	24
Electroforesis del ARNcd genómico de rotavirus.....	24
Obtención del ARNcd del rotavirus YM.....	25
Purificación del ARN de rotavirus YM en minicolumna.....	25
Transcripción reversa de los genes que codifican a NSP3 y NSP1	26
Amplificación de los genes que codifican a NSP1 y NSP3.....	28
Purificación del ADN obtenido por PCR en minicolumna Wizard.	28
Transcripción/traducción <i>in vitro</i> de NSP3 y NSP1.....	29
Inmunoprecipitación de NSP3.....	30
Co-inmunoprecipitación de NSP3 y NSP1 usando el anticuerpo policlonal anti-NSP3.....	31
Producción de NSP1-His6 (con cola de histidinas).....	32
Análisis de las fracciones solubles e insolubles de NSP1 y NSP3	33
Co-inmunoprecipitación de NSP3 y NSP1 usando el anticuerpo anti-His.....	33

Entrecruzamiento químico de NSP3 y NSP1 usando glutaraldehído.....	33
Determinación de los pesos moleculares de NSP3 y NSP1.....	35
VIII. RESULTADOS.....	36
1. Obtención y purificación de ARNcd de rotavirus.....	36
2. Expresión de NSP1 y NSP3 de rotavirus.....	37
3. El suero hiperinmune y ACMs anti NSP3 inmunoprecipitan a NSP3.....	40
4. Co-precipitación de NSP1 y NSP3 de rotavirusYM.....	41
4.1 Co-precipitación de NSP1 usando suero hiperinmune anti-NSP3 de rotavirus YM.....	41
4.2 Co-precipitación de NSP1 usando ACM anti-NSP3 de rotavirus YM.....	46
4.3 Co-precipitación de NSP1 usando suero hiperinmune anti-NSP3 de rotavirus SA-11.....	48
4.4 Co-precipitación de NSP3 usando suero hiperinmune anti-histidinas.....	50
5. Entrecruzamiento químico de NSP3 y NSP1.....	53
6. Análisis del estado oligomérico de NSP3 y NSP1.....	55
VII. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	60
VII. CONCLUSIONES.....	66
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
ANEXOS	

Lista de abreviaturas usadas

ACM	anticuerpo monoclonal
ADNc	ácido desoxiribonucleico complementario
ARNcd	ARN cadena doble
ARNm	ARN mensajero
β ME	2-mercaptoetanol
BSA	albúmina de suero bovina
CAP	5- metil guanosina
DEPC	dietilpirocarbonato
dNTPs	desoxinucleótido trifosfato
DTT	1,4-dithio-DL-treitol
KDa	kilodaltons
NA	número de acceso
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
RIPA	radioinmunoprecipitación
RT	transcripción reversa
Rf	factor de retención
SDS	dodecil sulfato de sodio
Tm	temperatura de fusión
μ Ci	microCouries
#C	número de catalogo

I. RESUMEN

Los rotavirus, el principal agente etiológico de gastroenteritis aguda en infantes menores de 5 años, son un género que pertenece a la familia *Reoviridae*. Presenta un genoma de 11 segmentos de ARN de cadena doble que codifican para 6 proteínas estructurales llamadas VPs y 6 proteínas no estructurales llamadas NSPs. Existe evidencia no concluyente que sugiere que las proteínas NSP1 y NSP3 podrían interactuar entre sí.

En este estudio nos propusimos determinar si NSP1 y NSP3 interactúan *in vitro*. Ambas proteínas se produjeron por transcripción/traducción *in vitro* y se analizó su interacción por co-precipitación usando anticuerpos monoclonales y policlonales anti-NSP3. También se analizó la interacción al precipitar a NSP1. Por carecer de un suero anti-NSP1, a NSP1 se le fusionó una cola de histidinas, y se usó un anticuerpo policlonal anti-histidinas en los ensayos. Los datos obtenidos sugieren fuertemente que NSP1 y NSP3 interactúan entre sí. En los ensayos de co-precipitación con anti-NSP3 como en los que se usó el anticuerpo anti-His, la cantidad de proteína co-precipitada fue muy poca por lo que no se logró determinar la estequiometría de la interacción.

La interacción proteica también se estudió por entrecruzamiento químico. Sin embargo, la formación de complejos de alto peso molecular impidió determinar la interacción de las proteínas virales por esta técnica. Se estudió el estado oligomérico de las proteínas expresadas *in vitro* encontrándose que estas forman complejos de alto peso molecular. La proteína NSP3 podría formar dímeros a tetrámeros mientras que, NSP1 podría formar oligómeros superiores a un tetrámero. Con base en los resultados obtenidos concluimos que NSP1 y NSP3 son capaces de interactuar *in vitro*, sin embargo la formación de grandes complejos oligoméricos en las condiciones usadas, restringe las posibilidades de interacción. Estos datos indican fuertemente que NSP1 y NSP3 interactúan *in vitro*, sin embargo, posiblemente la formación de complejos oligoméricos, restringe la interacción. Desconocemos la función de la interacción en la infección viral y son necesarios estudios para entenderla.

Rotaviruses, members of family Reoviridae, are a major cause of acute gastroenteritis of infants and young children. The rotavirus genome consists of eleven segments of double-stranded RNA that encode six structural (VP1-VP4, VP5, VP6) and six nonstructural (NSP1-NSP6) proteins. Based on inconclusive data from experiments in the yeast two-hybrid system it has been proposed that NSP1 and NSP3 interact with each other.

In this study we intended to determine if NSP1 and NSP3 interact *in vitro*. Both proteins were produced by *in vitro* translation (reticulocyte lysate) and interaction was analyzed by co-precipitation using anti-NSP3 monoclonal and polyclonal antibodies.

The co-precipitation data strongly suggest that NSP1 and NSP3 interact between them in the absence of viral mRNA. To corroborate these data, we precipitated NSP1. Because of lack of anti-NSP1 antibody, NSP1 was produced as a fusion protein with a His tag, so we can use an anti-His antibody to co-precipitate with NSP3. We find that NSP3 co-precipitates along with NSP1.

Both co-precipitations (with anti-NSP3 and anti-His antibodies) produced a very small quantity of the co-precipitated protein so it was not possible to determine the stoichiometric relation.

The interaction was also studied by chemical crosslinking. However, high molecular weight complexes were formed making no possible determination. We thought those high molecular weight complexes might be NSP1 or NSP3 oligomers and when we determined the oligomeric state we confirmed that hypothesis, since NSP3 was found as a dimer while NSP1 could form tetramers or upper oligomers.

These data indicate strongly that NSP1 and NSP3 interact *in vitro*; however, oligomeric complex formation possibly restricts the interaction. We ignore the interaction function in the viral infection and it is necessary for more studies to understand it.

II. INTRODUCCIÓN

La gastroenteritis aguda es una de las enfermedades más comunes en el hombre con un mayor impacto en niños y ancianos. Esta enfermedad es causada por bacterias, parásitos, virus y toxinas. Una gran proporción de diarreas en países desarrollados son atribuidas a virus, siendo rotavirus la causa más común de diarrea en niños menores de 5 años en el mundo y se calcula que de 450,000 a 650,000 niños mueren cada año a causa de la infección viral.

Los rotavirus pertenecen a la familia *Reoviridae* y su genoma contiene 11 segmentos de ARN de cadena doble que codifican para 12 proteínas, seis con funciones estructurales (VP1-VP4, VP6 y VP7) y seis con funciones no estructurales (NSP1-NSP6). A pesar de los avances en el conocimiento del virus, aun se desconocen muchos aspectos de la infección viral así como del papel de cada una de las proteínas virales, como es el caso de las proteínas no estructurales como NSP1 y NSP3. El estudio de la interacción de las proteínas NSP3 y NSP1 fue anteriormente abordado usando el sistema de los dos híbridos de levadura. Sin embargo, ninguno de los datos obtenidos en estos estudios confirman la interacción, por lo que el propósito de este trabajo es determinar si las proteínas NSP1 y NSP3 de rotavirus interactúan.

El estudio de la interacción proteica, se decidió abordar por co-precipitación *in vitro* ya que algunos antecedentes sugieren que esta es altamente dependiente de la conformación. Adicionalmente la co-precipitación *in vitro* también permite descartar la participación de otros elementos celulares o virales.

III. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar si las proteínas NSP1 y NSP3 de rotavirus producidas *in vitro* interactúan *in vitro* por co-precipitación. Si esta interacción existe se determinará el dominio de unión a NSP1 en la proteína NSP3 por co-precipitación de fragmentos proteicos de NSP3.

OBJETIVOS PARTICULARES

Clonar los genes que codifican a las proteínas NSP1 y NSP3 de rotavirus YM mediante el ensayo de transcripción reversa acoplado a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Se obtendrán las condiciones óptimas para su expresión *in vitro* a partir del promotor de la polimerasa T7.

- Producir las proteínas NSP3 y NSP1 por transcripción y traducción *in vitro*.
- Determinar si las proteínas NSP1 y NSP3 interactúan *in vitro* por co-precipitación con suero hiperinmune anti-NSP3.
- Generar en el gen que codifica a NSP3 deleciones apropiadas para truncar a la proteína en sus extremos amino y carboxilo.
- Producir fragmentos proteicos truncados en el extremo amino y carboxilo de la proteína NSP3 por transcripción y traducción *in vitro*.

IV. ANTECEDENTES

La gastroenteritis aguda es una de las enfermedades más comunes en el hombre con un mayor impacto en niños y ancianos. Se estima que causa alrededor de 2.4 a 2.8 millones de muertes anuales (Bern *et al.*, 1992, Murray y López, 1997) y es responsable del 25 % al 30 % de muertes en niños menores de 5 años (Martines *et al.*, 1991). Esta enfermedad es causada por bacterias, parásitos, virus y toxinas; la importancia de cada agente etiológico varía, sin embargo una gran proporción de diarreas en países desarrollados son atribuidas a virus, entre los cuales se encuentran rotavirus, calicivirus, astrovirus y adenovirus, siendo rotavirus la causa más común de diarrea en niños menores de 5 años en el mundo. Aunque la mayoría de las infecciones virales son moderadas, un tercio de estas requieren hospitalización y se ha estimado que entre 450,000 a 650,000 niños mueren cada año (Parashar *et al.*, 2001), a causa de la infección.

La infección con rotavirus ocurre en otras especies y rotavirus era conocido como agente etiológico de diarrea en estos animales desde la década de los cincuenta. Sin embargo, fue hasta 1973 cuando Bishop y colaboradores usando el microscopio electrónico (Figura 1) identificaron al virus en biopsias duodenales de niños con gastroenteritis severa (Bishop *et al.*, 1973).

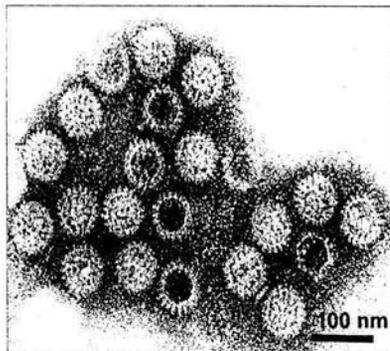


Figura 1. Partículas virales visualizadas por microscopía electrónica en muestras de un niño con gastroenteritis aguda.

1. Clasificación

Los rotavirus son virus de doble cadena de ARN (ARNcd) que se clasifican junto con otros ocho géneros dentro de la familia *Reoviridae*. Esta familia abarca virus no envueltos que poseen de 10 a 12 segmentos de ARNcd donde cada uno codifica para 1 a 3 proteínas. Las partículas virales de esta familia poseen un tamaño característico entre 60 a 85 nm (excluyendo las espículas que sobresalen de la superficie de la cápside) sin embargo, los distintos géneros exhiben diferencias significativas a nivel genético, bioquímico, estructural y biológico.

Los rotavirus son clasificados serológicamente en al menos siete grupos (A-G) que comparten antígeno de grupo (Kapikian *et al.*, 2001). Adicionalmente los rotavirus se han clasificado usando un sistema binario en base a la reactividad de las proteínas externas VP4 y VP7 que consta de 15 serotipos específicos de VP7 llamados G1 a G15 y 21 serotipos de VP4 llamados P1 a P21 (Kapikian *et al.*, 2001).

2. Estructura del virus

La apariencia morfológica de las partículas virales es distintiva cuando se observa al microscopio electrónico (Figura 1), por lo que se le dio el nombre de rotavirus (del latín *rota*= rueda) basándose en esta morfología (Flewett *et al.*, 1974), sin embargo, lo que ha permitido entender las bases estructurales del virión ha sido la crio-microscopía electrónica acoplada con el procesamiento de imagen. La Figura 2A muestra una reconstrucción de la imagen de rotavirus obtenida por microscopía electrónica (Prasad *et al.*, 1988, Yager *et al.*, 1994)

Las partículas virales presentan 3 capas proteicas concéntricas de simetría icosaédrica y no se encuentran envueltas en una membrana lipídica. Estas partículas poseen un diámetro aproximado de 102 nm e incluyen las espículas formadas por VP4, que sobresalen de la superficie. El diámetro de las partículas sin espículas es de 75 nm. En la Figura 2B se muestra un corte transversal de la partícula viral donde se observa la ubicación de algunas proteínas virales.

La capa proteica externa esta compuesta por 780 moléculas de la glicoproteína VP7 ordenadas en 260 trímeros y 120 moléculas de VP4 estructuradas en 60 espículas, los cuales interactúan con VP7 y VP6. Esta última proteína forma la capa proteica intermedia con 260 trímeros, la cual es interrumpida por 132 canales con una profundidad aproximada de 140 Å y con tres diferentes formas en relación con la simetría de la cápside: 12 del tipo I, 60 del tipo II y 60 del tipo III. En los canales tipo I se da la exportación de ARNm naciente, mientras que, en los otros canales se da la importación de los metabolitos requeridos para la transcripción.

La capa interna está compuesta por 120 moléculas de VP2 organizadas en 60 dímeros que interaccionan en su región amino con un heterodímero formado por las proteínas VP1 Y VP3, el cual está en estrecha interacción con el genoma viral. El genoma de rotavirus esta formado por 11 segmentos de ARNcd los cuales pueden tener una longitud variable de 0.6 a 3.3 Kb, sumando en total 18 Kb (Mattion *et al.*, 1996). Gran parte del ARNcd se encuentra organizado en estructuras dodecahédricas distribuidas alrededor de los complejos VPI-VP3 (Figura 2C) localizados en los vértices de simetría cinco (Prasad *et al.*, 1996).

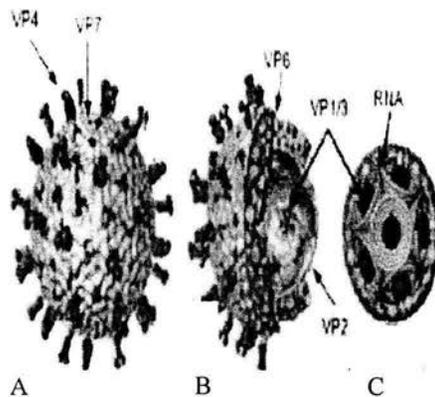


Figura 2. Partícula viral donde se aprecia: la capa proteica externa (A), la capa intermedia (B) y la capa interna (C) y la distribución propuesta del ARN en el virión. Tomado de Jayaram *et al.*, 2004

3. Patogénesis

La infección por rotavirus causa diarrea, deshidratación, anorexia, depresión y vómito (Morris *et al.*, 2001). La causa de la diarrea es más compleja de lo que inicialmente se pensaba ya que están involucrados una serie de factores tanto del huésped como virales, entre los que se han propuesto:

- Mala absorción como consecuencia de la atrofia parcial de las vellosidades del intestino delgado (Graham *et al.*, 1984).
- Activación del sistema nervioso entérico que provoca la liberación de un agente vasoactivo ocasionando cambios funcionales, aunque no la pérdida de la integridad del enterocito (Morris *et al.*, 2001).
- Secreción intestinal mediada por la proteína viral no estructural NSP4 la cual estimula la permeabilidad intestinal de Ca^{++} (Tian *et al.*, 1996) y altera la integridad celular epitelial (Newton *et al.*, 1997).

A pesar de que rotavirus presenta un marcado tropismo celular hacia los enterocitos, ocasionalmente se han detectado partículas virales en algunos órganos como hígado, riñón y pulmones (Brown *et al.*, 1998, Dharakul *et al.*, 1988) por lo que se le ha asociado a síndromes diferentes a la diarrea como encefalopatías (Ushiyama *et al.*, 1986, Kawashima *et al.*, 2004), otitis media (Hadziselimovic *et al.*, 1984), enterocolitis (Bocia *et al.*, 2001), abscesos hepáticos (Li *et al.*, 2001) y convulsiones (Goldwater *et al.*, 2001, Hung, *et al.*, 2003) entre otros. Sin embargo, no existe evidencia conclusiva de que el virus sea la causa de estos síntomas.

4. Epidemiología

La infección por rotavirus es ubicua y se transmite por la vía fecal-oral (Ward *et al.*, 1986). La transmisión puede ocurrir por ingestión de agua o alimentos contaminados así como por contacto con superficies contaminadas. Sin embargo

también se han reportado bajos títulos del virus en secreciones del tracto respiratorio y otros fluidos corporales lo que sugiere que el virus puede ser transmitido por otras vías.

De los siete grupos en que los rotavirus se han clasificado solo los grupos A, B y C han sido aislados en humanos, siendo el grupo A, el responsable de la gastroenteritis infantil severa encontrada de forma endémica en todo el mundo.

La distribución estacional de las infecciones por rotavirus del grupo A presenta un pico durante los meses de invierno en los países templados (Brandt *et al.*, 1983) mientras que en países tropicales y subtropicales los casos de infección se presentan en todas las estaciones del año (Cook *et al.*, 1990). Los serotipos específicos de rotavirus del grupo A que infectan a humanos varían con la época del año y la región geográfica incluyendo las diferencias observadas en distintas latitudes (Koopmans *et al.*, 1999). El estimado de la distribución global de muertes causadas por rotavirus del grupo A se presenta en la Figura 3.

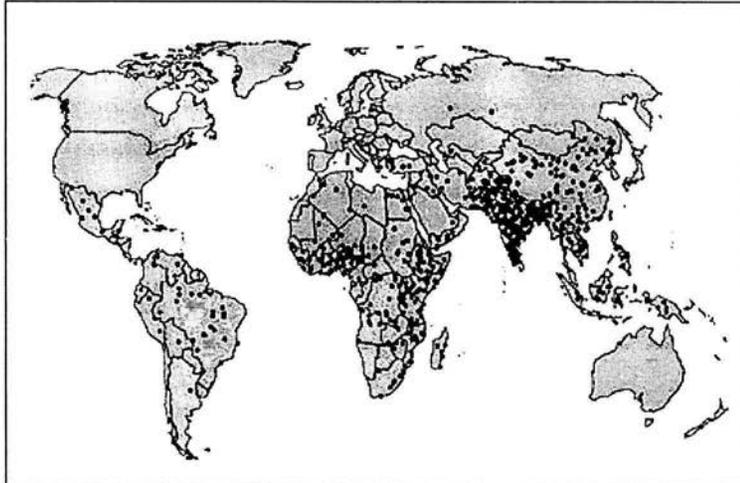


Figura 3. Estimado de la distribución global de muertes por rotavirus del grupo A. Cada punto representa 500 muertes por año. Figura tomada de Glass *et al.*, 1997

Por otro lado las infecciones causadas por rotavirus del grupo B se han presentado en forma de epidemias geográficamente localizadas en China causando diarrea severa en adultos en más de un millón de casos (Su *et al.*, 1995). En el caso de rotavirus del grupo C se han documentado casos esporádicos de infección tanto en niños como adultos (Jiang *et al.*, 1995).

5. Ciclo de replicación viral

La replicación de rotavirus se lleva a cabo enteramente en el citoplasma de la célula infectada. El modelo de replicación viral planteado consiste en las siguientes etapas:

A) Adsorción del virus a los receptores celulares y entrada a la célula huésped. Se desconocen los mecanismos de entrada del virus a los enterocitos, sin embargo se ha planteado que esta puede ser mediada por endocitosis o penetración directa. Existe evidencia de que algunos de los receptores o co-receptores que participan en este proceso son integrinas, gangliósidos GM3, proteínas hsp70, entre otros (Coulson *et al.*, 1997, Arias *et al.*, 2001).

B) Producción de ARN mensajero en el citoplasma por partículas virales bicapa. En la entrada del virus a la célula huésped se pierde la capa proteica externa al parecer como consecuencia de cambios conformacionales en VP7 causados por una disminución en la concentración de calcio (Dormitzer and Greenberg, 1992).

La formación de partículas bicapa (DLPs) permite la activación de la transcriptasa viral, donde la ARN polimerasa dependiente de ARN (asociada con las DLPs) transcribe el ARNdc produciendo los 11 ARNm virales los que a su vez son traducidos en 12 proteínas virales (Lawton *et al.*, 2000) o alternativamente pueden ser usados como moldes para la síntesis de ARNcd genómico, el que al ser encapsidado genera nuevas partículas virales (Clark *et al.*, 1980).

C) Ensamble de las partículas virales. Durante el ciclo replicativo viral se generan regiones discretas perinucleares llamadas viroplasmias, donde se seleccionan los distintos componentes del genoma viral y se ensamblan partículas virales de una capa proteica formadas por VP2, VP1, VP3 y los 11 ARNm virales. El ensamble de las partículas virales monocapa ocurre de forma simultánea con la producción de ARNcd genómico por parte de la ARN polimerasa (VP1). Posteriormente VP6 se une para formar partículas bicapa también en el viroplasma.

D) Formación de partículas tricapa. Las partículas bicapa geman al RER adquiriendo así una envoltura lipídica transitoria en la que se ubican VP4, VP7 y NSP4 (Stirzaker *et al.*, 1987). Se ha descrito que la proteína VP4 interacciona con balsas lipídicas (Sapin *et al.*, 2002) por lo que se ha sugerido que estos microdominios actúan como plataforma para el ensamble final de los virus donde al parecer NSP4 actúa como receptor intracelular de las partículas bicapa. Posteriormente la envoltura lipídica es removida resultando en virus maduro con tres capas proteicas.

E) Liberación de partículas infecciosas. La salida de los viriones de las células hospederas cultivadas *in vitro* se da por lisis celular (Musalem *et al.*, 1985) aunque se ha encontrado que los viriones maduros son liberados por la cara apical de los enterocitos (Jordan *et al.*, 1997).

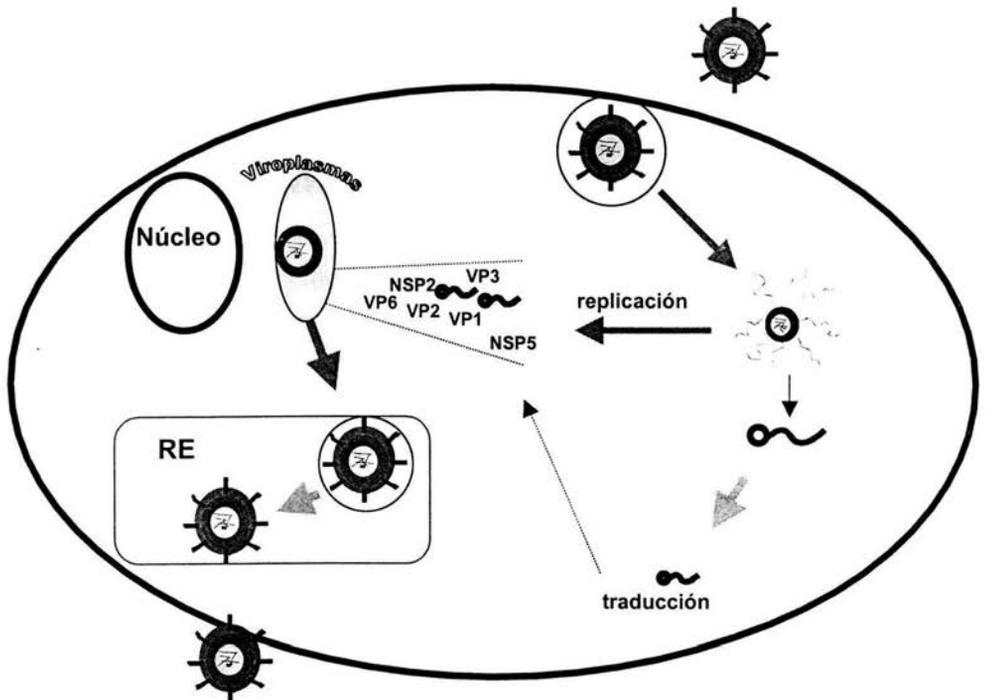


Figura 5. Esquema del ciclo de replicación de rotavirus.

6. ARN y proteínas virales

Los ARNm de rotavirus contienen regiones no traducibles (RNT) de longitud variable en sus extremos 5' y 3'. En el caso del grupo A todos los genes poseen una secuencia conservada GGC en el extremo 5' y otra secuencia UGACC en el extremo 3' (Figura 6).



Figura 6. Organización de un segmento del genoma de rotavirus mostrando las regiones no traducibles, las secuencias consenso en los extremos 5' y 3' y la región intermedia que codifica para una proteína.

Los genes de rotavirus son monocistrónicos, es decir, codifican para una sola proteína, con excepción del gen 11 que codifica para dos. Seis de los genes codifican para las proteínas estructurales (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 y VP7) llamadas así porque se encuentran en las partículas virales maduras y poseen funciones relacionadas con la estructura, replicación y patogenicidad viral. Los otros cinco genes codifican para las proteínas no estructurales (NSP1- NSP6) las cuales solo se encuentran en células infectadas y están relacionadas con la replicación del genoma, la traducción de ARNm y el ensamble del virión (Mattion *et al.*, 1996).

Tabla 1. Características generales de las proteínas de rotavirus del grupo A.

Proteína	Segmento del genoma	Especificidad de unión a ARNm viral	Sitio de acumulación	Comentarios
VP1	1	Extremo 3' del ARNm	Viroplasma	ARN polimerasa dependiente de ARN
VP2	2	No específica	Viroplasma	Requerida para la síntesis de ARNcd
VP3	3	No específica	Viroplasma	Guanililtransferasa
VP4	4	-----	Citoplasma	Proteína de superficie, hemaglutinina, Virulencia, unión a zinc
NSP1	5	Extremo 5' del ARNm	Citoesqueleto	Interacciona con IFR-3
VP6	6	-----	Viroplasma	Proteína de la capa intermedia, forma trímeros
NSP3	7	Extremo 3' del ARNm	Citoesqueleto	Forma dímeros e interacciona con eIF4G
NSP2	8	No específica	Viroplasma	Forma octámeros y participa en la replicación de ARN,
VP7	9	-----	RE	Glicoproteína de superficie, neutralización
NSP4	10	-----	RER	Enterotoxina, glicoproteína transmembranal
NSP5	11	Se une a ARNcs	Viroplasma	Proteína cinasa
NSP6	11	No se sabe	No se sabe	Fosfoproteína no estructural

7. Proteína no estructural NSP3

La proteína no estructural NSP3 de 315 aminoácidos es el producto del gen 7 de rotavirus. Se trata de una proteína moderada abundancia en células infectadas (Ericson *et al.*, 1982) y distribuida en el citoplasma a manera de filamentos por lo que se ha sugerido que se asocia con el citoesqueleto (Mattion *et al.*, 1992).

Parte de la estructura de NSP3 se ha resuelto por cristalografía encontrándose que la proteína forma dímeros, y mientras el extremo amino posee estructuras α -hélice y β -plegada (Deo *et al.*, 2002), el extremo carboxilo es rico en estructuras α -hélice (Groft *et al.*, 2002), como se observa en la Figura 7.

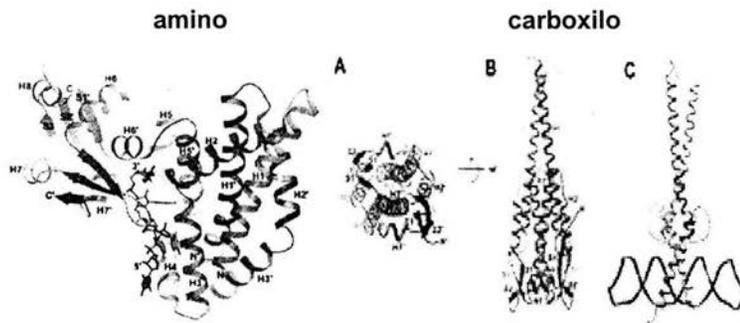


Figura 7. Estructura de la proteína NSP3. El extremo amino (1-149 aa) fue co-cristalizado con el oligonucleótido UGACC y el extremo carboxilo fue co-cristalizado con un polipéptido correspondiente a los aminoácidos 132-160 del factor de inicio de traducción eIF4G.

Estructuralmente NSP3 se puede dividir en dos dominios. El primer dominio abarca de una región básica muy conservada entre los aminoácidos 83-150 precedida por una región ácida entre los aminoácidos 150-169 (Figura 8). El segundo dominio consiste en dos regiones con secuencias hepta-repetidas (HR), las cuales son residuos hidrofóbicos espaciados cada siete aminoácidos que se

encuentran ubicadas entre los aminoácidos 181–236 y 275-305, esta última región forma un cierre de leucina.

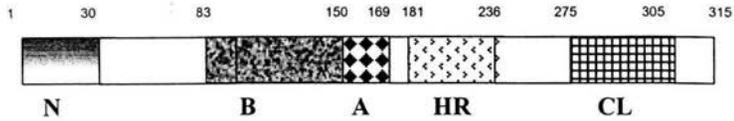


Figura 8. Estructura de la proteína NSP3. Se señalan las cisteínas C y las regiones: N, neutra; B, básica; A, ácida; HR, hepta-repetida; CL, cierre de leucina.

Con base en las características funcionales de la proteína esta se puede dividir en 3 regiones. Entre los aminoácidos 4-149 se ubica el dominio de unión a ARN seguido por el dominio de dimerización ubicado entre los aminoácidos 150-206 y el dominio de unión al factor de iniciación de traducción eucariote eIF4G, que se localiza en los aminoácidos 206-313 en el extremo carboxilo (Piron *et al.*, 1999). Estos dominios fueron definidos por ensayos *in vitro* de unión a ARN, y en el caso de los dominios de dimerización y de unión a eIF4G por el método de los dos híbridos en levadura.

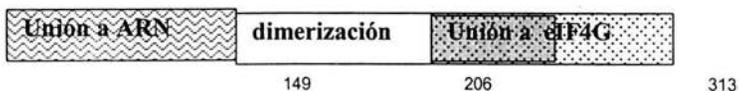


Figura 9. Representación de los dominios funcionales de la proteína NSP3

7.1 Papel de NSP3 en la síntesis de proteínas celulares

La mayoría de los ARNm eucarióticos se caracterizan por poseer una estructura 7-metil-G (5')ppp(5') N llamada cap en el extremo 5' donde N es

cualquier nucleótido, mientras que en el extremo 3' presentan poliadenilación consistente de aproximadamente 200 adeninas (Sachs *et al.*, 1993). En contraste los ARNm de rotavirus presentan cap en el extremo 5' (Imai *et al.*, 1985) pero no la estructura poli-A en el extremo 3', la cual es sustituida por la secuencia de 5 nucleótidos altamente conservados UGACC, que constituye el blanco reconocido específicamente por NSP3 (Poncet *et al.*, 1993).

Se ha propuesto que el inicio de la traducción eucariótica esta facilitado por la interacción del extremo 3'- poli A y el extremo 5' del ARNm, mediado por factores de inicio de traducción eucariótica como eIF4E, eIF4G y la proteína de unión a poli-A (PABP); para que ocurra la circularización la proteína PABP interacciona con la cola de poli-A ubicada en el extremo 3' de los ARNm celulares y la estructura cap ubicada en el extremo 5' de los ARNm funciona como sitio de ensamble del complejo heteromérico eIF4F, el cual incluye a los factores de inicio de traducción eucariótica eIF4E, eIF4A y eIF4G, este último une interacciona con la proteína PABP logrando la circularización (Figura 10a). Los ARNm de rotavirus no tienen poli-A pero NSP3 se une a la secuencia consenso 5'-GACC-3' de estos e interacciona con el factor eIF4G (figura 10b) (Michel *et al.*, 2000, Vende *et al.*, 2000), funcionando como un análogo de la proteína de unión a poli-A (PABP) en la traducción de ARNm virales. La proteína NSP3 desplaza a PABP de su interacción con eIF4G al unirse con mayor afinidad (Groft *et al.*, 2002) lo cual resulta funcionalmente en inhibición de la síntesis proteica celular (Padilla-Noriega *et al.*, 2002).

a) ARNm eucariótico

b) ARNm viral

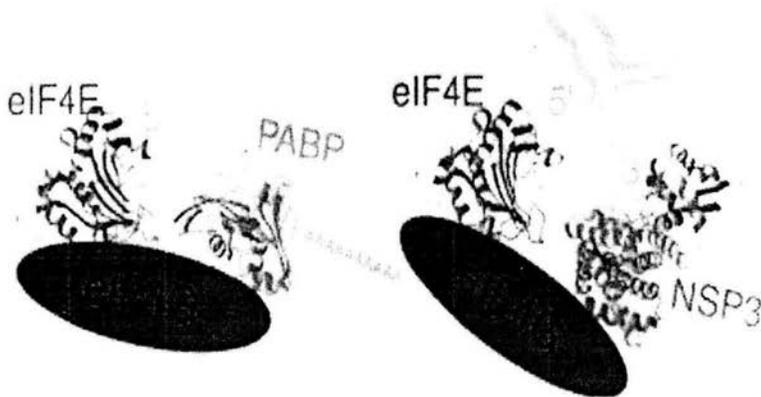


Figura 10. Los extremos 5' y 3' de los RNAm virales(a) y eucarióticos (b) sinérgicamente estimulan el inicio de la síntesis proteica. Figura generada por MOLMOL y tomada de Varani *et al.*, 2002

7.2 Papel de NSP3 en la replicación del genoma

El reconocimiento de la secuencia UGACC en el extremo 3' de los ARNm virales por NSP3 (Poncet, 1993) junto con el reconocimiento de una secuencia no identificada en el extremo 5' por NSP1 podrían favorecer la formación de un complejo tripartito en el inicio de la replicación. Inicialmente el complejo NSP3-ARNm-NSP1 podría unirse al citoesqueleto mediante NSP1 y/o NSP3. Antes de que el ARNm se ubique en los viroplasmos se forma un intermediario de replicación llamado IR prenúcleo.

Este intermediario de replicación podría formarse cuando el complejo NSP1/ARNm/NSP3 en presencia de VP1 y VP3 (Figura 11) sufriera un desplazamiento competitivo, ya que VP1 y VP3 se unen específicamente a los blancos reconocidos por estas proteínas (Gallegos *et al.*, 1989). El siguiente paso, es la adición de VP2 al intermediario de replicación, gracias a sus propiedades de unión a VP1 y de autoensamble, con el que se comienza a estructurar la capa proteica interna del virión formando el intermediario IR núcleo (Gonzalez *et al.*, 2000). La maduración del IR núcleo para convertirse en IR VP6, ocurre con el ensamble de VP6 sobre VP2 (Figura 11). La

formación de partículas virales maduras resulta de la interacción de VP6 con VP4 que se ubica en el citoplasma, y con NSP4, localizada junto con VP7 en el retículo endoplasmico de la célula (Meyer *et al.*, 1989).

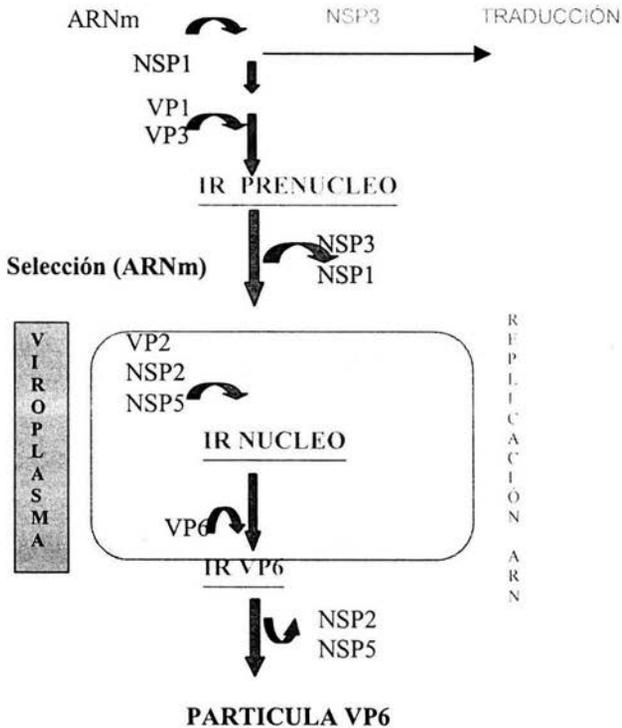


Figura 11. Diagrama de las posibles interacciones secuenciales de las proteínas virales durante la replicación y encapsidación del genoma viral. Se subrayan los intermediarios de la replicación (IR) identificados, los cuales son complejos entre el ARN y proteínas virales específicas.

8. Proteína no estructural NSP1

El gen 5 de rotavirus codifica para NSP1 cuya composición varía de 486 a 495 aminoácidos (Okada *et al.*, 1999) entre las distintas cepas virales. El análisis

comparativo de secuencias de NSP1 entre cepas de rotavirus del grupo A indica que existe solo el 61 % de identidad entre residuos aminoácidos. El análisis comparativo de las secuencias de NSP1 con proteínas del grupo C de rotavirus indica que el porcentaje de identidad es menor a 34 % (Dunn *et al.*, 1994).

A pesar de que NSP1 es la proteína viral menos conservada, esta posee un dominio de unión a zinc entre los aminoácidos 42-72 (Figura 12) conservado en los grupos A y C de rotavirus (Bremont *et al.*, 1993, Hua *et al.*, 1993). Tal dominio esta compuesto por secuencias repetidas de histidinas y cisteínas; [cis- X2-cis-X5-cys-X2-cis-] adicionalmente podría existir otro dominio ubicado en el extremo carboxilo (Hua *et al.*, 1994).



Figura 12. Estructura de la NSP1. Dominio de unión a zinc. □ Posible sitio de unión a zinc

El gen que codifica a NSP1 pertenece a un grupo de cuatro genes virales cuya transcripción se da en etapas tempranas de la infección y es independiente de la síntesis de otras proteínas virales (Johnson & McCrae, 1989). Esta proteína se expresa en bajas concentraciones en células infectadas (Ericson *et al.*, 1982). Recientemente se ha determinado que el ARNm del gen 5 se encuentra asociado a fracciones subpolisomales lo que sugiere que los bajos niveles de NSP1 son resultado de un ineficiente inicio de la traducción (Mitzel *et al.*, 2003).

La proteína NSP1 se distribuye de manera difusa en el citoplasma. Usando una serie de construcciones de la proteína, se determinó que los aminoácidos 84 al 176 son necesarios para su distribución intracelular, la cual es independiente de la presencia o ausencia de otras proteínas (Hua *et al.*, 1994). Esta distribución así como la localización de la proteína en extractos celulares que corresponden al

citoesqueleto sugiere que la proteína se encuentra asociada a algún componente del mismo, sin embargo esta interacción no se ha demostrado.

La proteína NSP1 tiene la capacidad de unirse específicamente a los ARNm virales (Brottier *et al.*, 1992). Usando una serie de deleciones de NSP1 y analizando su capacidad de unirse al ARNm, se ha determinado que los primeros 81 aminoácidos del extremo amino participan en esta unión, co-localizando con el dominio de unión a zinc (Hua *et al.*, 1994)

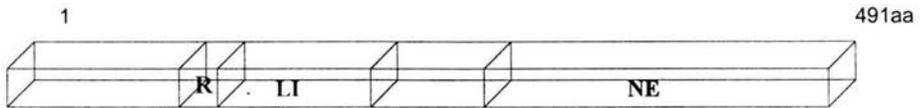


Figura 13. Posibles dominios funcionales de NSP1; R, participa en la unión a ARN; LI, posible dominio de localización intracelular; NE, esta región no es esencial para la viabilidad del virus en cultivos celulares.

Se han descrito variantes de rotavirus con genotipos atípicos generados por duplicaciones o deleciones en la secuencia de los segmentos que codifican para las proteínas VP6, NSP1, NSP2, NSP4 o NSP5 (Desselberger *et al.*, 1996). Estos cambios casi siempre ocurren río abajo del marco abierto de lectura (ORF) por lo que codifican para la proteína completa, excepto en algunos re-arreglos en los que se altera el marco abierto de lectura generando deleciones en el extremo carboxilo (Tian *et al.*, 1993, Hua & Patton 1994). Estas cepas fueron obtenidas de animales inmunodeficientes y niños inmunocomprometidos y se purificaron en cultivos celulares, donde presentaron un fenotipo de placas pequeñas pero con títulos virales similares a los silvestres. Por lo anterior, se ha sugerido que NSP1 podría ser dispensable (al menos su extremo carboxilo) para la replicación viral en células en cultivo.

La proteína NSP1 ha sido implicada como factor de virulencia en ratones (Broome *et al.*, 1993) sin embargo, estos datos no son concluyentes ya que esto no sucede en conejos y lechones (Ciarlet *et al.*, 1998, El-Attar *et al.*, 2001, Bridger *et al.*, 1998). Adicionalmente, se ha propuesto que NSP1 podría participar

contrarrestando la respuesta celular antiviral ya que interacciona con el factor regulatorio de interferón 3 (Graff *et al.*, 2002), el cual induce la respuesta de interferon α e interferon β (Braganca *et al.*, 1998). Esta interacción apoya el papel de la proteína como modulador de la respuesta inmune, sin embargo, el papel de interferón en una infección con rotavirus no es claro y existen datos que sugieren que interferón no es un mediador importante de protección en ratones (Angel *et al.*, 1999).

9. Antecedentes de una posible interacción de NSP1 y NSP3

Existen algunos antecedentes en la literatura que sugieren una interacción entre las proteínas no estructurales NSP1 y NSP3 de rotavirus. En 1992, Mattion *et al.*, estudiaron el estado oligomérico de la proteína NSP3 en lisados de células de insecto SF9 infectadas con baculovirus recombinantes para expresar el gene de NSP3. Encontraron que NSP3 forma oligómeros de diferentes pesos moleculares, uno mayoritario de 100 kDa y uno de 80 kDa. En este mismo estudio, se analizó el efecto de otras proteínas virales no estructurales sobre el estado oligomérico de NSP3 por lo que, se realizaron co-infecciones con otras proteínas virales recombinantes en baculovirus. En la co-infección de NSP1 y NSP3 no se observó la formación de heterooligómeros, sin embargo NSP1 afecta la proporción de los oligómeros de NSP3. Estos datos sugieren algún tipo de interacción de manera directa o indirecta entre las dos proteínas de manera independiente del ARNm viral.

Un antecedente mas directo sobre la posible interacción entre estas proteínas es el estudio realizado por González *et al.*, en 1998, donde se estudiaron las interacciones *in vivo* de proteínas no estructurales de rotavirus usando el sistema de dos híbridos de levadura. En este estudio, se encontro que NSP1 interacciona con las proteínas NSP3, NSP2, NSP5 y NSP6, donde la interacción mas fuerte se da con NSP3, según un ensayo semi-cuantitativo de β -galactosidasa. Sin embargo, estas interacciones solo se observaron usando la

construcción de NSP1 fusionada al dominio de unión de ADN del regulador transcripcional de galactosa y no con la construcción de NSP1 fusionada al dominio de activación del regulador transcripcional de galactosa. Estos resultados no son concluyentes y se requiere la confirmación de esta interacción. En el mismo estudio y usando el sistema de los dos híbridos de levadura se intentó localizar el dominio de unión de NSP3 en NSP1, por lo que se realizaron deleciones en los extremos amino y carboxilo de ambas proteínas. Sin embargo, a excepción de la deleción en los últimos 6 aminoácidos del extremo carboxilo de NSP3, todas las demás deleciones resultaron en pérdida de la interacción con la otra proteína. El mismo efecto se observó cuando se hicieron deleciones en la proteína NSP3.

La interacción entre NSP3 y NSP1 también fue sugerida por Graff *et al.*, en el 2002 donde usando el sistema de dos híbridos de levadura se determinó que NSP1 interacciona con el factor regulatorio de interferón IRF-3. La interacción NSP1-IRF-3 también se analizó por co-precipitación de NSP1 obtenida de células infectadas con rotavirus y GST-IRF-3 recombinante, con suero anti-GST observándose que además de la co-precipitación de NSP1 también co-precipitó a NSP3. Estos datos no confirman la interacción, ya que NSP1 como NSP3 interaccionan con el ARNm viral por lo que la interacción entre estas puede estar mediada por el ARNm viral. Adicionalmente, tampoco se puede descartar que la interacción sea a través de IRF3 (con el que interacciona NSP1) o a través de otra proteína celular.

V. METODOLOGIA

La composición de los reactivos utilizados en la metodología se encuentran descritos en el anexo C.

Producción del virus

Se cultivó la línea celular MA-104 de células fetales de riñón de mono usando Medio Mínimo Esencial de Eagle (MEM) con suero fetal bovino (SFB) al 10 %. Antes de la infección las células confluentes contenidas en frascos F175 fueron lavadas 2 veces con MEM sin SFB. El virus se activó con tripsina [10 μ g/mL final] para lo cual se colocó en un tubo Falcon: 2.5 mL de virus YM (sin titular) y 12.5 μ L de tripsina [2 mg/mL] los cuales se mezclaron suavemente y se incubaron a 37°C por treinta minutos. El virus activado (0.5 mL) se adicionó a cada frasco F175 conteniendo 24.5 mL de MEM s/SBF y 10 μ L de tripsina [2 mg/mL].

Las células se incubaron a 37°C y 5 % de CO₂ durante 48 horas, observándose un efecto citopático caracterizado por células refringentes y desprendimiento de las mismas. El virus producido se cosechó y se obtuvo un lisado celular que se colectó y se almacenó a -20°C en alícuotas de 30 mL.

Electroforesis del ARN genómico de rotavirus

El ARNcd viral se extrajo con fenol-cloroformo y se detectó el patrón electroforético del ARNcd de rotavirus por electroforesis y tinción con nitrato de plata. Para la extracción se mezclaron 200 μ L del lisado de células infectadas con rotavirus con 50 μ L de buffer disruptor 5x, 200 μ L de fenol saturado y 200 μ L de cloroformo. Esta mezcla se agitó en vórtex moderado por dos minutos y se centrifugó a 17,500 *g* durante cinco minutos. La fase acuosa (90 μ l) se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 0.6 mL y se adicionaron 10 μ L de azul de bromofenol.

El análisis del ARNcd se realizó por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 %, que se corrió a 6.3 mA durante 15 horas. Posteriormente el gel se colocó

en una solución fijadora de etanol 10 %-ácido acético 0.1 % durante 30 minutos con agitación suave y se transfirió a una solución de nitrato de plata 0.18 % durante 30 minutos. El gel se lavó brevemente con agua dos veces y se sumergió en 200 ml de solución reveladora de formaldehído 0.8 % e hidróxido de sodio 3 % hasta que se observó el patrón de bandas. La reacción se detuvo retirando la solución reveladora y adicionando ácido acético al 5 %.

Obtención de ARNcd de rotavirus YM

Para la obtención del ARNcd primero se semipurificaron las partículas virales por centrifugación diferencial y se extrajo el genoma viral con fenol-cloroformo y SDS. A una alícuota de 30 mL del lisado celular que contenía al virus se le adicionaron 10 mL de triclorofluorometano para liberar al virus que interacciona con membranas y se agitó en vórtex por 30 segundos. Posteriormente la muestra se centrifugó a 19,600 g en un rotor Beckman AJ20 durante 20 minutos para precipitar los desechos celulares y el sobrenadante se transfirió a tubos Ultra-Clear en volúmenes de 5 mL c/u, en los que se ultracentrifugó a 59,255 g en un rotor SW 55 ti durante 90 minutos a 4°C para precipitar las partículas virales. El botón conteniendo el virus se resuspendió en 150 µL de agua por cada tubo. A 200 µL del virus se adicionaron en 50 µL de buffer de disrupción 5x, 200 µL de fenol, 200 µL de cloroformo y se agitó 2 minutos en vórtex moderado. Finalmente se centrifugó a 11,750 g durante 5 minutos y la fase acuosa conteniendo el ARN genómico viral fue almacenada a -20°C.

Purificación del ARN de rotavirus YM en minicolumna

El ARNcd genómico de rotavirus se purificó por extracción con fenol/cloroformo y cromatografía de adsorción en columnas RNAeasy .

En un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL se colocaron: 100 µL de virus YM, 100 µL de fenol y 100 µL de cloroformo, la mezcla se agitó por 1 minuto en vórtex y se centrifugó por 3 minutos a 11,750 g colectando y midiendo la fase superior. En

preparación para la adsorción del ARN a la resina de la minicolumna se mezclaron 100 μ L de la fase acuosa con 350 μ L de buffer de lisis RLT y 250 μ L de etanol absoluto y se mezclaron. Esta solución se colocó suavemente en una minicolumna RNAeasy, la cual estaba colocada en un tubo de recolección de 2 mL y se centrifugó por 15 segundos a 8,160 g. La minicolumna se transfirió a un nuevo tubo de recolección de 2 mL y se le adicionaron 500 μ L de buffer RPE y se centrifugó por 15 segundos a 8,160 g. En el último lavado se agregaron 500 μ L de buffer RPE sobre la columna, y se centrifugó por 2 minutos a 16,000 g. La minicolumna se colocó en un nuevo tubo de recolección de 1.5 mL y se añadieron 30 μ L de agua destilada libre de RNasas directamente sobre la membrana incubando 2 minutos a temperatura ambiente. El genoma viral se recuperó cuando la minicolumna se centrifugó 1 minuto a 10 000 g. El ARN purificado se analizó corriendo 5 μ L de la muestra en un minigel de agarosa al 1 % a 100 V, incluyendo un control de 500 ng de marcador de 1 Kb.

Transcripción reversa de los genes que codifican a NSP1 y NSP3

Los oligonucleótidos utilizados para la transcripción reversa y la amplificación de los genes que codifican a NSP1 y NSP3 del rotavirus YM se diseñaron utilizando el programa DNAMAN y en base a la secuencia del gen 5 reportada por Kojima (Kojima *et al.*, 1996, num. de acceso en el Genbank D38154) y en la secuencia del gen 7 de rotavirus YM que nos fue proporcionada por la Dra. Susana López (Instituto de Biotecnología, UNAM). Las secuencias completas de ambas proteínas se encuentran en el anexo B.

Para amplificar el gene 5 se utilizaron los siguientes oligonucleótidos sintetizados por Invitrogen:

- YMT55 (secuencia 5' a 3'): CAA TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA TGG CTA CCT TCA AAG. Este oligonucleótido contiene la secuencia del promotor de la ARN polimerasa T7 (CAA TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG) necesario para la

transcripción/traducción *in vitro*, también contiene el codón de inicio ATG y la secuencia inicial del gen 5 de YM del nucleótido 1 al 13. Tm 59.2°C.

- YMX35 (secuencia 3'-5'): CGT TAC TCA ACA TCA GAT AGA C. Este oligonucleótido contiene la secuencia complementaria de los últimos 22 nucleótidos del gen 5 del rotavirus YM. Tm 46°C.

Para la amplificación del gen 7 de rotavirus YM se utilizaron los siguientes oligonucleótidos sintetizados por Roche:

- YMT75 (secuencia 5' a 3'): CAA TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA TGG AGT CTA CTC AGC. Este oligonucleótido contiene la secuencia del promotor de la ARN polimerasa T7 (CAA TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG) necesario para la transcripción/traducción *in vitro*, y además contiene el codón de inicio ATG y la secuencia inicial del gen 7 de YM del nucleótido 1 al 13. Tm 70.2°C.

- YMX3 (secuencia 3'-5'): GAC TAT TCA TAC GTA CAT TCA TAG. Corresponde a la secuencia complementaria a los nucleótidos 921 a 943 del gen 7 de YM. Tm 50.5°C.

El ADN complementario (ADNc) de los genes 5 y 7 se produjo a partir de ARNcd genómico del rotavirus YM. Para producir ADNc se usó una mezcla de transcripción reversa de 10 μ L totales, conteniendo 2.5 μ L RNAd de YM, 0.5 μ L H₂O y 0.5 μ L de cada uno de los oligonucleótidos correspondientes al segmento a amplificar [10 μ M]. La mezcla se incubó a 94°C por 3 minutos y al bajar la temperatura a 55°C se adicionaron 5 μ L de la mezcla de RT conteniendo: 2 μ L de buffer de síntesis de ADNc 5x, 0.5 μ L DTT [0.1 M], 0.5 μ L RNAase Out, 0.5 μ L H₂O, 1.0 μ L de la mezcla de desoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs) [10 mM] y 0.5 μ L de la transcriptasa reversa Thermo Script. La mezcla se incubó a 55°C durante 60 minutos y después por 5 minutos a 85°C para inactivar la enzima. A la mezcla se le adicionó 0.5 μ L de RNAsa H para degradar el ARN dejando libre al ADNc y se incubó por 20 minutos a 37°C. El ADNc obtenido se utilizó como molde para amplificar los genes 5 o 7 del rotavirus YM por reacción en cadena de polimerasa.

Amplificación de los genes que codifican a NSP1 y NSP3

La amplificación del ADNc de los segmentos 5 y 7 de rotavirus YM se realizó por reacción en cadena de la polimerasa. La reacción se llevo a cabo usando un volumen final de 20 μL que contenía: 0.8 μL del ADNc del segmento a amplificar, 12.8 μL H_2O , 0.4 μL dNTP's [10.0 mM], 0.8 μL de cada uno de los oligonucleótidos 5' y 3' correspondientes, 2.0 μL buffer A 5x y 2 μL de buffer B 5x (para obtener una concentración final de 1.5 mM de Mg^{+2}), y 0.5 μL de la enzima *Elongasa* [1 U/ μL]. El programa utilizando en el termociclador fue 30 segundos de desnaturalización a 94 °C, 30 segundos de alineación a 50°C y 60 segundos de extensión a 68°C, durante 30 ciclos. Al final de la reacción 2 μL del ADNc amplificado se analizaron en un minigel de agarosa al 1 % en buffer TAE 1X conteniendo 30 μL de bromuro de etidio [0.5 mg/mL], que se corrió 100 V, durante 1 hora. Se usaron 5 μL de marcador de peso molecular de ADN lineal de 1 Kb para estimar el número de pares de bases del ADN producido.

Purificación del ADN obtenido por PCR en minicolumna Wizard

El ADN producido por PCR se purifico en una minicolumna Wizard, la cual se basa en la afinidad de la resina por los ácidos nucleicos para la purificación. Se colocaron 100 μL del buffer de purificación directa en un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL, más 60 μL de ADN y 1.0 mL de resina, se homogenizaron en vórtex por 1 minuto y la mezcla de ADN/resina se depositó en la minicolumna pasándola lentamente a través de ella. Posteriormente se depositaron 2 mL de isopropanol grado HPLC al 80 % para lavar la columna y se centrifugó por 2 minutos a 13,800 g La minicolumna se transfirió a otro tubo de microcentrifuga y se agregaron 30 μL de agua y se centrifugó por 20 segundos a 13,800 g para eluir los fragmentos de ADN unidos a la resina. El ADN purificado se cuantificó por electroforesis utilizando un minigel de agarosa al 1% que se corrió a 100 V durante 1 hora. A

partir del marcador de ADN de 1 Kb se estimó el rendimiento de la reacción. El ADN purificado se almacenó a -20°C .

Transcripción/traducción in vitro de NSP1 y NSP3

Para la transcripción / traducción *in vitro* de las proteínas NSP3 y NSP1 se usó un sistema basado en la ARN polimerasa T7 y reticulocitos de conejo. Para la expresión de NSP3 se usó un sistema de transcripción/traducción acoplada con el sistema TNT T7. En un tubo de 200 μL a 4°C se adicionaron para un volumen final de 20 μL : 1.0 μL agua libre de nucleasas, 400 ng de ADN purificado del gen 7 de rotavirus, 15 μCi (1 μL) de metionina Redivue® ^{35}S [15 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$]. La mezcla Master TNT Quick, (conteniendo el lisado de reticulocitos así como los factores necesarios para la transcripción/ traducción) se retiró de -70°C , se descongeló rápidamente y justo después de la descongelación se adicionaron 16 μL de la mezcla Master TNT Quick al tubo y se incubaron por 90 minutos a 30°C . Se tomaron 5 μL de cada una de las reacciones y se mezclaron con 5 μL de buffer de muestra 1x, los cuales se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 12 %. El gel se procesó para su análisis por autorradiografía y se expuso en un casete de Fosforimager analizando la imagen obtenida en el analizador FX usando el software Quantity One.

Para la producción de NSP1 se usó un sistema de transcripción y traducción simultánea TNT T7 optimizada para productos de PCR. En un tubo de 200 μL a 4°C se colocaron para un volumen final de 20 μL : 150 ng de ADN del gene 5 del rotavirus YM, 15.0 μCi (1 μL) de metionina ^{35}S Redivue. La mezcla Master Quick PCR se descongeló y rápidamente se adicionaron 16 μL de esta a cada tubo. Las muestras se incubaron por 90 minutos a 30°C y después se tomaron 5 μL de cada reacción y se mezclaron con buffer de muestra 1x los cuales se analizaron por electroforesis usando un gel al 12 % de poliacrilamida-SDS. El gel se procesó para su análisis por autorradiografía.

Inmunoprecipitación de NSP3

La inmunoprecipitación de NSP3 se realizó primero precubriendo a la proteína A-sefarosa con los anticuerpos policlonales anti-NSP3 y posteriormente retirando el exceso de anticuerpo. Posteriormente se hizo reaccionar al complejo proteína A-sefarosa-anticuerpo con las proteínas radioactivas en presencia de detergentes suaves.

En tubos de 1.5 mL se colocaron 20 μ L de proteína A-sefarosa, 0.5 mL de PBS frío, 5 μ L de Triton X-100 al .01 % y 1 μ L del anticuerpo monoclonal anti-VP6 IE11 (control negativo) o 1 μ L de suero hiperinmune anti NSP3. Las muestras se incubaron por 3 horas a 4°C con agitación constante. Posteriormente las muestras se microcentrifugaron a 16,000 g durante 1 minuto a 4°C. Los complejos anticuerpo-proteína A-sefarosa se lavaron dos veces con 1 mL de buffer no desnaturizante y nuevamente se microcentrifugaron a 16,000 g durante 1 minuto a 4°C. A cada tubo se le adicionaron 10 μ L de albúmina bovina 10%.

En otro tubo de 1.5 mL se colocaron 5 μ L de NSP3 con 0.3 mL de buffer de lisis no desnaturizante para cada muestra y 12 μ L de inhibidor de proteasas Complete 25x. Esta solución se adicionó a cada uno de los tubos con el complejo proteína A-sefarosa-anticuerpo mezclando suavemente y se incubaron por 3 horas y media a 4°C con agitación. Después de la incubación se centrifugó 1 minuto a 16,000. Las perlas de sefarosa se lavaron 3 veces con 1 mL de buffer de lavado B (astringencia media) frío y una vez con PBS frío, centrifugando a 16,000 g y retirando el sobrenadante con vacío cada vez. A cada uno de los tubos se le adicionaron 40 μ L de buffer de muestra Laemli 1 x y las muestras se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 %. Se usaron como control marcadores con 14 C de bajo peso molecular marcados. El gel se procesó para su análisis autoradiográfico y se determinó la presencia de complejos entre NSP3 y los anticuerpos monoclonales inmunoprecipitados usando el analizador de imágenes FX.

Co-inmunoprecipitación de NSP3 y NSP1 usando el anticuerpo policlonal anti-NSP3

La co-inmunoprecipitación de las proteínas NSP1 y NSP3 se realizó precubriendo a la proteína A-sefarosa con los anticuerpos policlonales anti-NSP3 del rotavirus YM producidos en ratón o del rotavirus SA11 producidos en conejo. Posteriormente se retiró el exceso de anticuerpo y se hizo reaccionar el complejo proteína A-sefarosa-anticuerpo con NSP3 y NSP1, marcadas radiactivamente. El procedimiento se describe a continuación de manera general, sin embargo en algunos ensayos se modificó la naturaleza de los anticuerpos con los que se inmunoprecipitó a NSP3. También se modificaron las condiciones de astringencia de los lavados que se realizan después de la incubación del complejo proteína A-sefarosa-anticuerpo con las proteínas de interés.

En tubos de 1.5 mL se colocaron 20 μ L de proteína A-sefarosa, 0.5 mL de PBS frío, 5 μ L de Tritón X-100 al 0.1 % y 1 μ L del anticuerpo monoclonal 255/60, o del anticuerpo usado para inmunoprecipitar a NSP3 de rotavirus YM. Estos anticuerpos pueden provenir del suero hiperinmune anti-NSP3 de rotavirus YM o del suero hiperinmune anti-NSP3 de rotavirus SA11 o del ACM anti-NSP3 PNS31 del rotavirus YM. Las muestras se incubaron por 180 minutos a 4°C y posteriormente se microcentrifugaron 1 minuto a 16,000 g. Los complejos anticuerpo-proteína A-sefarosa se lavaron dos veces con 1 mL de buffer de lisis no desnaturizante y se microcentrifugaron durante 1 minuto a 16,000 g a 4°C. A la pastilla que quedó después de retirar el sobrenadante en cada tubo se le adicionaron 10 μ L de albúmina bovina 10%.

En otro tubo de 1.5 mL se mezclaron 5 μ L de NSP3 y 10 μ L de la proteína NSP1 con 0.3 mL de buffer de lisis no desnaturizante para cada muestra, y 12 μ L de inhibidor de proteasas Complete 25 x. Esta última solución se adicionó a cada uno de los tubos que contenían el complejo proteína A-sefarosa-anticuerpo y se incubaron por 210 minutos a 4°C con agitación. Después de la incubación las muestras se centrifugaron 1 minuto a 16,000 g y se retiró el sobrenadante. En este punto las perlas de sefarosa se lavaron usando 1 mL de buffer de lavado, el

cual puede ser de baja, media o alta astringencia por la naturaleza de los detergentes que contienen (tabla 2). Después de lavar 3 veces con el buffer seleccionado, se lavó una vez con PBS frío y se centrifugo a 16 000 g, se retiró el sobrenadante. A cada uno de los tubos se le adicionaron 40 μ L de buffer de muestra Laemli 1x. Las muestras se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 %-SDS corridos a 200 V por 6 horas. Como control se usaron marcadores con ^{14}C de alto peso molecular. El gel se procesó para su análisis autorradiográfico y usando el analizador de imágenes FX se determinó por densitometría la presencia de la proteína NSP1 co- inmunoprecipitada con NSP3.

Tabla 2. Composición de los buffers usados en los ensayos de co-precipitación

Buffer de lavado	Composición
A. Buffer de baja astringencia	1% Nonidep P40 y 1% desoxicolato de sodio
B. Buffer de astringencia media	1% Triton X-100, 1% desoxicolato de sodio y 0.1 % SDS
C. Buffer de alta astringencia	1% Triton X-100 y 0.3 % SDS

Producción de NSP1-His6 (con cola de histidinas)

Para la producción de NSP1 unida en su extremo carboxilo a una cola de 6 histidinas se usó el sistema TNT T7 para ADN. Para la producción de esta proteína se usó la construcción pET 28-RRV5 producida por Wilbert O. Zarco en el laboratorio. Esto permitió expresar a NSP1 con una cola de histidinas en su extremo carboxilo terminal y adicionalmente poseer el promotor de la polimerasa T7 para su expresión *in vitro*. En un tubo de 200 μ L a 4°C se colocaron para un volumen final de 20 μ L: 150 ng de ADN del plásmido pET28-RRV5, 15.0 μ Ci de metionina ^{35}S Redivue. La mezcla Master Quick se descongeló y rápidamente se

adicionaron 16 μL de esta al tubo que contenía el ADN. Las muestras se incubaron por 90 minutos a 30° C y después se tomaron 5 μL de cada reacción y se mezclaron con buffer de muestra 1x. Posteriormente, se analizaron por electroforesis usando un gel de poliacrilamida-SDS al 12 %. El gel se procesó para su análisis por autorradiografía.

Análisis de las fracciones solubles e insolubles de NSP1 y NSP3

En el análisis de las fracciones solubles e insolubles de NSP3 y NSP1 se usaron 15 μL de cada proteína producida *in vitro*. Estos volúmenes se colocaron separadamente en 2 tubos de 600 μL y se centrifugaron a 16,000 g durante 5 minutos. Después de centrifugar, las fracciones solubles de las proteínas se transfirieron a tubos eppendorf de 200 μL y se les adicionaron 50 μL de buffer de lisis no desnaturizante. A los tubos conteniendo las pastillas de proteínas insolubles se adicionaron 50 μL de buffer de lisis no desnaturizante y ambas fracciones se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 12 %. El gel se procesó para su análisis por autorradiografía.

Co-inmunoprecipitación de NSP3 y NSP1 usando el anticuerpo anti-His en condiciones de astringencia baja

La co-inmunoprecipitación de NSP3 y NSP1-His6 se realizó precubriendo a la proteína A-sefarosa con el anticuerpo policlonal anti-His (H-15:sc-803). Posteriormente, se retiró el exceso de anticuerpo y se hizo reaccionar el complejo sefarosa-proteína A-anticuerpo con NSP1 en presencia de NSP3, ambas marcadas radiactivamente. En tubos de 1.5 mL se colocaron 20 μL de proteína A-sefarosa, 0.5 mL de PBS frío, 5 μL de Tritón X-100 0.01 % y 1 μL de anticuerpo monoclonal anti-VP6 255/60 (control negativo), y del anticuerpo anti-His o el anticuerpo anti-NSP3. Las muestras se incubaron por 3 horas a 4°C, posteriormente se centrifugaron 1 minuto a 16,000 g y los sobrenadantes se desecharon. Los complejos anticuerpo-proteína A-sefarosa se lavaron 2 veces

con 1 mL de buffer de lisis no desnaturalizante y se microcentrifugaron por 1 minuto a 16,000 g, adicionando a la pastilla del segundo lavado 10 μ L de albúmina bovina al 10%.

En otro tubo de 1.5 mL se colocaron 5 μ L de NSP3 y 10 μ L de NSP1 con 0.3 mL de buffer de lisis no desnaturalizante para cada muestra y 12 μ L de inhibidor de proteasas Complete 25 x. La solución anterior se adicionó a cada uno de los tubos con el complejo proteína A–sefariosa–anticuerpo –y se incubaron por 210 minutos a 4°C con agitación. Después de la incubación, la muestra se centrifugó 1 minuto a 16,000 g, se retiró el sobrenadante y las pastillas con las perlas de sefariosa se lavaron 3 veces con 1 mL de buffer de lavado de baja astringencia frío. A continuación, las perlas se lavaron una vez con PBS frío, se centrifugaron a 14,000 g y posteriormente se retiró el sobrenadante con vacío. A cada uno de los tubos se le adicionaron 40 μ L de buffer de muestra 1 x y se corrieron electroforéticamente en geles de poliacrilamida al 12 %-SDS, usando como control marcadores con 14 C de alto peso molecular. El gel se procesó para su análisis autoradiográfico y se analizó con el equipo FX para determinar la presencia de NSP1 y NSP3.

Entrecruzamiento químico de NSP3 y NSP1 usando glutaraldehído

Se realizaron ensayos de entrecruzamiento químico usando glutaraldehído como agente entrecruzante. El glutaraldehído es un di-aldehído capaz de formar compuestos heterocíclicos de las bases de las proteínas que se encuentren a una distancia menor de 12 Å (Meade *et al.*, 2003). En un tubo de microcentrifuga de 0.6 mL se colocaron 5 μ L de la proteína NSP3 y 10 μ L de NSP1 y se les adicionaron 220 μ L de buffer de entrecruzamiento para un volumen final de 235 μ L. A esta mezcla se adicionaron 0.75 μ L de glutaraldehído al 5 % para una concentración final de 0.15% y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Como control de la reacción se usaron 10 μ L de cada proteína, los cuales se colocaron en un tubo de 0.6 mL y se adicionaron 220 μ L de buffer de entrecruzamiento así como 0.75 μ L de glutaraldehído al 5 %. Para detener la

reacciones, se adicionaron 15 μ L de glicina 2 M, pH 7.3 (concentración final 113 mM) y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaron 130 μ L de buffer de muestra Laemli 3x. Las muestras se hirvieron durante 5 minutos, y se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 12 % usando marcadores 14 C de alto peso molecular. El gel se procesó para su análisis autoradiográfico y se analizó con el equipo FX para determinar la presencia de NSP1 y NSP3.

Determinación de los pesos moleculares de las proteínas NSP3 y NSP1.

El peso molecular de los oligómeros formados por NSP3 y NSP1 se analizó por electroforesis en condiciones nativas. Tanto NSP3 como NSP1 fueron analizadas en una serie de geles con concentraciones de poliacrilamida de 8%, 10 % y 12% en condiciones nativas y se calcularon los coeficientes de retardo (K_R) los cuales fueron obtenidos de la pendiente negativa de 100 ($\log R_f * 100$) *versus* el porcentaje del gel. Se usaron las siguientes proteínas como marcadores de peso molecular: ureasa (545 KDa hexámero, 272 KDa trímero), albúmina serica bovina (132 KDa dímero y 66 KDa monómero) ovalbúmina (45 KDa), anhidrasa carbónica bovina (29 KDa) y α -lactoalbúmina (14.2 KDa). De la grafica del $\log K_R$ de estos marcadores *versus* el peso molecular de estas proteínas se obtuvo una curva estándar en la cual se interpolaron los datos obtenidos de las proteínas y de esta manera se determinó el peso molecular de NSP1 y NSP3.

VI. RESULTADOS

1. Obtención y purificación de ARNcd de rotavirus

Inicialmente comprobamos la identidad del rotavirus porcino YM por electroforesis de ARN genómico viral, ya que el patrón de migración electroforético obtenido por este método es una especie de "huella digital" única para cada cepa viral y diferencias hasta de un nucleótido pueden ser detectadas en la longitud por esta técnica (Dunn *et al.*, 1993). Para obtener ARN genómico de rotavirus se infectaron células MA-104 con rotavirus YM y el ARNcd se semi-purificó con fenol-cloroformo-SDS. Después de la extracción, el ARNcd genómico se analizó por electroforesis en gel de poliacrilamida y tinción con sales de plata y se comparó el patrón electroforético del ARNcd viral producido con el patrón del ARNcd de la cepa parental, encontrándose que los patrones son idénticos, como se observa en la Figura 14. El patrón electroforético de rotavirus contiene 11 genes numerados de acuerdo a su movilidad electroforética, sin embargo por las condiciones utilizadas en el ensayo en el gel se observan dos pares de bandas que co-migraron (2-3 y 8-9).

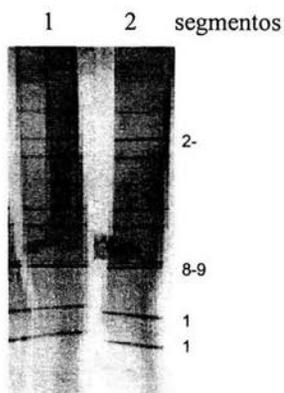


Figura 14. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 % y tinción con sales de plata de ARNcd genómico del rotavirus YM. Carril 1, YM producido para este estudio; carril 2, rotavirus YM cepa parental.

Después de comprobar la identidad del ARNcd obtenido mediante la infección de células con rotavirus, éste se purificó usando la resina RNeasy (Qiagen). El ARNcd purificado se analizó por electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio (Figura 15) obteniendo un patrón en el que se aprecian los distintos grupos de genes característicos de rotavirus YM (1-4, 5-6, 7-9 y 10-11).

Los ARNcd genómicos de rotavirus migran más en geles de agarosa que los correspondientes al ADN de los controles por ejemplo el segmento genómico 1 de rotavirus tiene 3302 bases pero migra como ADN de 2.3 kilobases, mientras que el segmento genómico 11 de rotavirus tiene 667 bases pero migra aproximadamente como ADN de 0.4 kilobases.

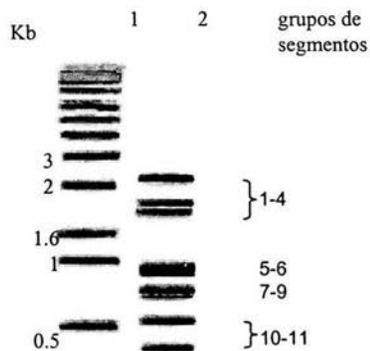


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio de ARNcd del rotavirus YM purificado. Carril 1, marcador de peso molecular de ADN de 1 Kb; carril 2, ARNcd del rotavirus YM.

2. Expresión de NSP1 y NSP3 de rotavirus

El ARNcd purificado se usó como molde para amplificar a los genes que codifican a NSP1 y NSP3 respectivamente. La amplificación se realizó por transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de polimerasa (RT-PCR),

y se usaron oligonucleótidos específicos que contenían las secuencias del gen de interés y del promotor de la ARN polimerasa T7, lo que permitió que los genes puedan ser transcritos y traducidos *in vitro*. Los productos amplificados se analizaron por electroforesis en gel de agarosa y se determinó su peso molecular usando un marcador de ADN lineal de 1 Kb. Los pesos moleculares de los genes amplificados corresponden con los esperados (Figura 16) es decir 1 Kb para el gene de NSP3 (939 pares de bases) y 1.5 Kb para el gene de NSP1 (1567 pares de bases).

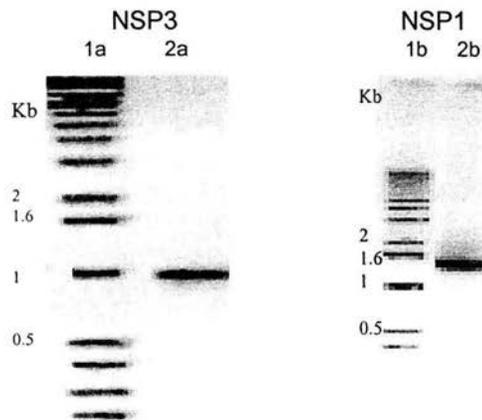


Figura 16. Amplificación por RT-PCR de los genes que codifican a NSP3 y NSP1 del rotavirus YM. Carriles 1a y 1b, marcador de peso molecular de 1 Kb; Carril 2a, ADN amplificado del gen que codifica a NSP3; Carril 2b, ADN amplificado del gen que codifica a NSP1.

Los ADN amplificados se purificaron usando minicolumnas Wizard para eliminar compuestos y sales que pudieran afectar la expresión proteica. Una vez purificado el ADN se usó para expresar a NSP3 y NSP1 *in vitro* utilizando un sistema de transcripción/traducción acoplado. El sistema depende de la ARN polimerasa del bacteriófago T7 para transcribir el gen de interés, y de un lisado de reticulocitos que contiene la maquinaria necesaria para traducir el ARNm

producido. Este sistema se usó para producir a NSP3 y NSP1 marcadas radiactivamente con metionina ^{35}S , las cuales se analizaron por electroforesis y autorradiografía encontrándose dos proteínas mayoritarias cuyos pesos moleculares aparentes son de 34 KDa y 53 Kda los cuales corresponden con los pesos moleculares de NSP3 y NSP1, respectivamente (Figura 17). En el gel también se observaron otras proteínas de menor peso molecular en menor concentración, las cuales podrían ser productos de terminación prematura en la síntesis o degradación por proteasas, sin embargo, la presencia de estos productos no es importante porque los resultados de la inmunoprecipitación se analizaron por electroforesis. Esto permite distinguir a las proteínas de interés por su migración electroforética. En este sentido, es importante hacer notar que en ensayos posteriores se logró disminuir la proporción de estos productos minoritarios. Por otro lado, la cantidad de las proteínas mayoritarias producidas no fue la misma en los dos ensayos, ya que NSP3 se expresó en este y en ensayos posteriores en mayor cantidad que NSP1 (Figura 17).

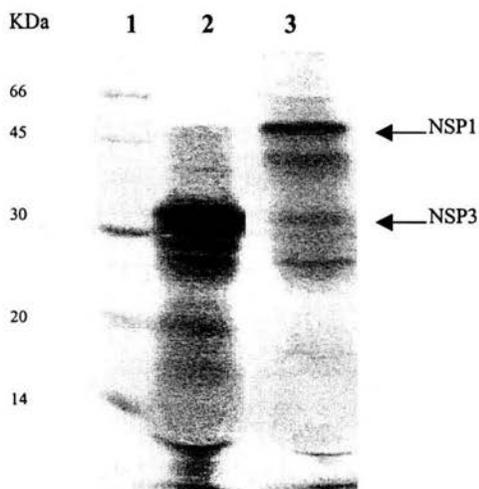


Figura 17. Transcripción/traducción *in vitro* de las proteínas NSP1 y NSP3 del rotavirus YM. Carril 1, marcador de peso molecular; Carril 2, 5 μL del producto del gen que codifica a NSP3; Carril 3, 10 μL del producto del gen que codifica a NSP1.

3. El suero hiperinmune y los ACMs anti-NSP3 inmunoprecipitan a NSP3

Siendo el objetivo del proyecto determinar si existe interacción entre NSP3 y NSP1 se decidió estudiar esta interacción por co-inmunoprecipitación, para lo cual primero se analizó la capacidad tanto del suero hiperinmune como de los anticuerpos monoclonales (ACMs) anti-NSP3 para inmunoprecipitar a NSP3. Se encontro que tanto el suero hiperinmune como los cinco ACMs precipitan a NSP3 de rotavirus YM producida por transcripción y traducción *in vitro*, aunque los ACMs precipitan con mayor eficiencia a NSP3 por lo que consideramos que ambos pueden ser usados en los ensayos de co-precipitación (Figura 18).

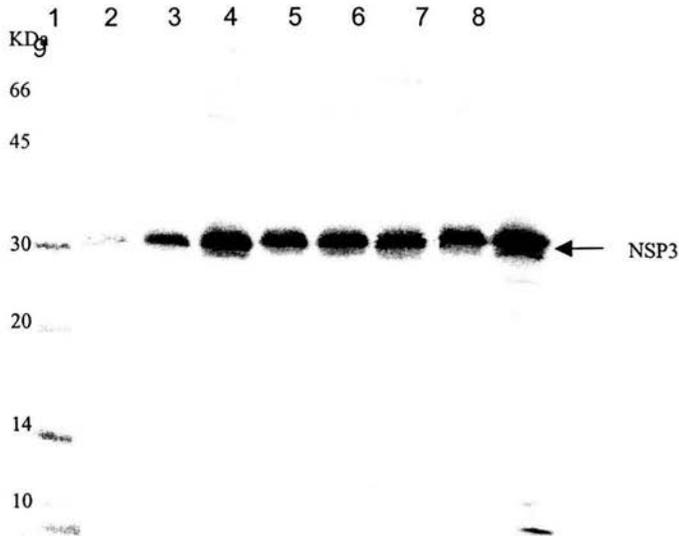


Figura 18. Inmuno-precipitación de NSP3 del rotavirus YM con suero hiperinmune de raton anti-NSP3 de YM y con los ACMs anti-NSP3: PNS31, PNS32, PNS34, PNS35, PNS36, en condiciones de astringencia media. Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, inmunoprecipitación de NSP3 con anti VP6 1E11 (control negativo); carril 3, inmunoprecipitación de NSP3 con suero hiperinmune anti-NSP3; carriles 4-8, inmunoprecipitación de NSP3 con PNS31 (carril 4), PNS32 (carril 5), PNS34 (carril 6), PNS35 (carril 7), y PNS36 (carril 8). El carril 9 muestra a NSP3 sin inmunoprecipitar.

4. Co-precipitación de NSP1 y NSP3 de rotavirus YM

4.1 Co-precipitación de NSP1 usando suero hiperinmune anti-NSP3 de rotavirus YM

Los ensayos de co-inmunoprecipitación proteica se realizaron partiendo de que NSP3 al ser inmunoprecipitada por los anticuerpos anti-NSP3 podrá co-precipitar a NSP1 si interacciona con ella. Inicialmente se uso el suero hiperinmune de ratón anti-NSP3 de rotavirus YM en 2 condiciones de astringencia en los lavados (buffer A para astringencia baja y buffer B para astringencia media). Los resultados obtenidos se analizaron por electroforesis y autorradiografía, encontrándose que NSP3 fue inmunoprecipitada por el suero hiperinmune anti-NSP3 de manera eficiente y similar a los resultados obtenidos anteriormente. Sin embargo, NSP1 no fue co-inmunoprecipitada por el suero hiperinmune anti-NSP3 o al menos no fue detectable en ninguna de las condiciones de astringencia usadas (Figura 19). En las condiciones de baja astringencia, se observó una banda inespecífica de NSP3 en el carril del control negativo en donde no se usaron anticuerpos anti-NSP3 (carril 3). la misma banda aunque en menor concentración también se observó en las condiciones de astringencia media (carril 7). En experimentos posteriores se logró disminuir la señal del fondo al pre-centrifugar la proteína NSP3 producida *in vitro* para eliminar a la proteína insoluble (ver adelante). En este ensayo no fue posible demostrar la co-inmunoprecipitación de NSP1 con el anticuerpo policlonal anti-NSP3, aunque hay que hacer notar que la cantidad de NSP1 usada fue baja en relación a la cantidad de NSP3.

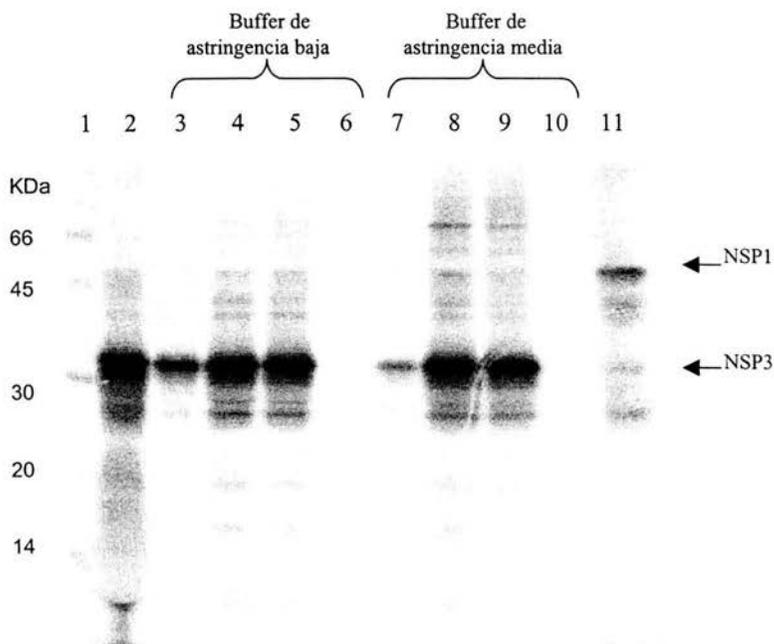


Figura 19. Co-inmunoprecipitación de NSP1 y NSP3 por el suero hiperinmune de ratón anti-NSP3 del rotavirus YM en condiciones de astringencia baja y media. Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, NSP3 sin inmunoprecipitar; carriles 3 y 7, co-precipitación de NSP3 y NSP1 con anti VP6 1E11 (control negativo); carriles 4 y 8, inmunoprecipitación de NSP3 con suero hiperinmune anti-NSP3; carriles 5 y 9, co-precipitación de NSP3 y NSP1 con suero hiperinmune anti-NSP3; carriles 6 y 10, inmunoprecipitación de NSP1 con suero hiperinmune anti-NSP3; carril 11, NSP1 sin inmunoprecipitar.

Una de las posibles razones por las cuales no se observó la co-precipitación es que NSP1 interacte con NSP3 de manera no equimolar (1:1) por lo que la cantidad de proteína usada en el ensayo no sea suficiente para su detección. Para explorar esta posibilidad, se decidió aumentar la cantidad de NSP1 en el ensayo. Sin embargo como el sistema usado para producir esta proteína *in vitro* presentaba baja eficiencia, se cambió por un sistema de transcripción/traducción para productos de PCR, el cual produjo una mayor cantidad a NSP1 que el anterior, como se observa en la Figura 20.

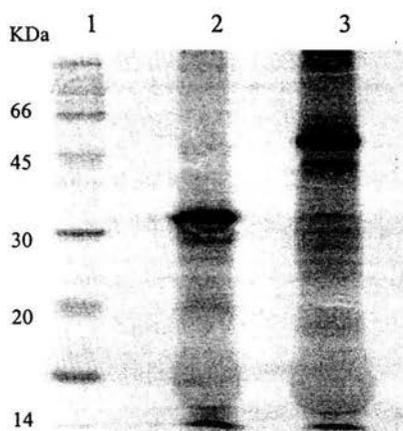


Figura 20. Producción de la proteína NSP1 usando el sistema de transcripción/traducción optimizado para productos de PCR. Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, NSP3 (5 μ L); carril 3, NSP1 (10 μ L).

La presencia de NSP3 en los controles negativos y los estudios de Mattion y colaboradores que sugieren que NSP3 puede formar agregados (Mattion *et al.*, 1992) nos llevó a explorar la posibilidad de que NSP3 estuviera formando multímeros insolubles, los cuales pueden afectar la interacción proteica. Se analizaron las fracciones solubles e insolubles de las proteínas por centrifugación y electroforesis y se observó que la fracción mayoritaria tanto de NSP3 como de NSP1 producidas *in vitro* se encuentra en la fracción soluble del lisado de reticulocitos (Figura 21) lo que sugiere que ambas proteínas están disponibles para interactuar.

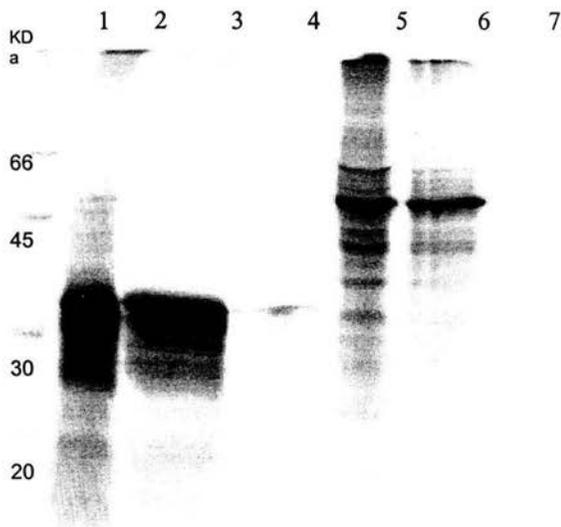


Figura 21. Análisis de las fracciones solubles e insolubles de NSP3 y NSP1. Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, 10 μ L de NSP3 sin tratamiento; carril 3, fracción soluble de NSP3; carril 4, fracción insoluble de NSP3; carril 5, 10 μ L de NSP1 sin tratamiento; carril 6, fracción soluble de NSP1; Carril 7, fracción insoluble de NSP1.

En el siguiente ensayo se decidió aumentar la cantidad de NSP1 y usar condiciones de astringencia baja en los lavados, con el propósito de no afectar la estabilidad de las interacciones NSP1-NSP3 y afectar de esta manera la interacción. Los resultados obtenidos de la co-precipitación fueron analizados por autorradiografía y muestran que NSP3 fue eficientemente inmunoprecipitada en el ensayo, aunque las condiciones de baja astringencia en los lavados causaron un aumento considerable del fondo en los controles negativos (Figura 22, carril 3). En este ensayo también observamos que NSP1 fue co-inmunoprecipitada junto con NSP3 (carriles 5 y 6). En contraste, el suero hiperinmune anti-NSP3 no fue capaz de inmunoprecipitar a NSP1 sola (carril 7).

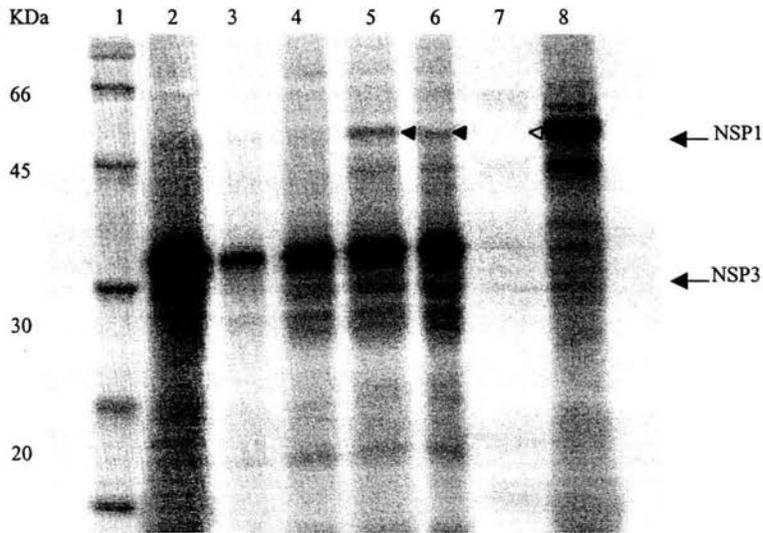


Figura 22. Co-inmuoprecipitación de NSP3 y NSP1 con suero hiperinmune anti-NSP3 del rotavirus YM en condiciones de baja astringencia. Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, NSP3 sin inmunoprecipitar; carril 3, inmunoprecipitación de NSP3 y NSP1 con anticuerpo anti-VP6 1E11 (control negativo); carril 4, inmunoprecipitación de NSP3 con suero hiperinmune anti-NSP3; carriles 5 y 6, inmunoprecipitación de NSP1 y NSP3 con suero hiperinmune anti-NSP3; carril 7, co-inmunoprecipitación de NSP1 con suero hiperinmune anti-NSP3; carril 8, NSP1 sin inmunoprecipitar. Se señala con triángulos sólidos a NSP1 co-inmunoprecipitada con anticuerpos anti-NSP3 y con un triángulo vacío su ausencia cuando NSP3 no esta presente en el ensayo.

Con el fin de resolver el alto fondo que se obtuvo de NSP3 en presencia de un anticuerpo contra una proteína no relacionada usado como control negativo se decidió usar condiciones de mayor astringencia en los lavados (en presencia de SDS al 0.3%) condición en la que se eliminó el fondo (Figura 23, carril 3) y se confirmó que NSP1 es co-precipitada con el suero hiperinmune anti-NSP3 y aunque la cantidad de NSP1 co-precipitada (carril 5) fue muy poca comparada con la inmunoprecipitada de NSP3 es claro que el suero anti-NSP3 no fue capaz de inmunoprecipitar a NSP1 sola (carril 4). Este resultado indica que NSP1 y NSP3 interaccionan, sin embargo la cantidad NSP1 precipitada es mínima y por

lo tanto se decidió tratar de aumentar la sensibilidad del ensayo modificando algunas de sus condiciones de manera que se favoreciera la señal de la interacción.

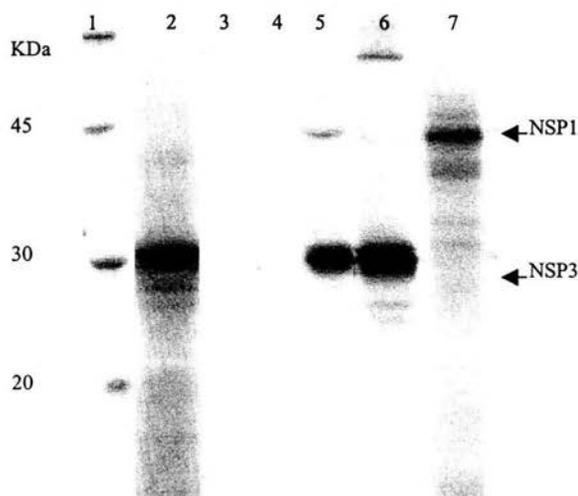


Figura 23. Co-inmunoprecipitación de NSP3 y NSP1 del rotavirus YM con suero hiperinmune anti-NSP3 del rotavirus YM en condiciones de alta astringencia. Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, NSP3 sin inmunoprecipitar; carril 3, inmunoprecipitación de NSP3 y NSP1 con anticuerpo anti-VP6 IE11 (control negativo); carril 4, inmunoprecipitación de NSP1 con suero hiperinmune anti-NSP3; carril 5, inmunoprecipitación de NSP1 y NSP3 con suero hiperinmune anti-NSP3; carril 6, inmunoprecipitación de NSP3 con suero hiperinmune anti-NSP3; carril 7, NSP1 sin inmunoprecipitar.

4.2 Co-precipitación de NSP1 usando el ACM anti-NSP3 de rotavirus YM

Con el propósito de favorecer la eficiencia para detectar la interacción proteica, se cambió el suero hiperinmune de ratón anti-NSP3 de rotavirus YM por el ACM PNS31 anti-NSP3 de YM, que de acuerdo al ensayo previo inmunoprecipita a NSP3 con mayor eficiencia que el suero hiperinmune anti-YM. Inicialmente no se había usado este ACM, por la posibilidad de que este reconozca el mismo sitio en NSP3 necesario para interaccionar con NSP1. Los

resultados obtenidos en la co-precipitación de NSP1 y NSP3 muestran que NSP1 es inmunoprecipitada junto con NSP3 de manera concordante con los resultados anteriores en condiciones de alta astringencia (Figura 24). Estos resultados confirmaron la interacción entre NSP3 y NSP1 ya que NSP1 claramente co-precipita junto con NSP3 (carril 5) y el anticuerpo PNS31 no es capaz de inmunoprecipitar a NSP1 sola (carril 6) ni inmunoprecipita con un ACM no relacionado (carril 3). Sin embargo, la cantidad de NSP1 precipitada no aumentó a pesar del uso de anticuerpos más eficientes para inmunoprecipitar a NSP3 como es el caso del ACM PNS31.

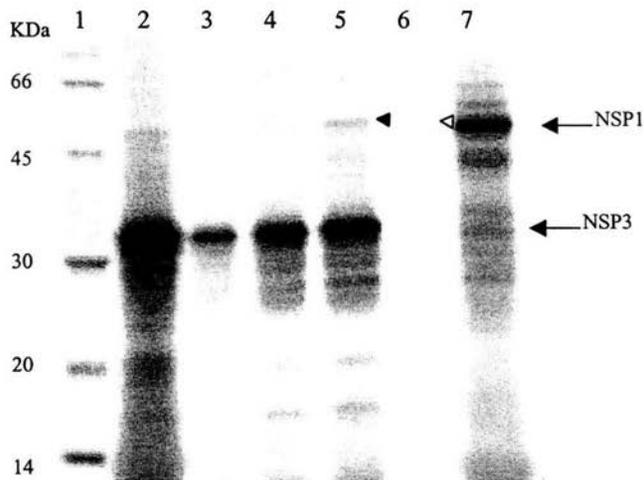


Figura 24. Co-inmunoprecipitación de NSP3 y NSP1 del rotavirus YM con el ACM PNS31 en condiciones de astringencia baja. Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, NSP3 sin inmunoprecipitar; carril 3, co-inmunoprecipitación de NSP3 y NSP1 con anti-VP6 1E11 (control negativo); Carril 4, inmunoprecipitación de NSP3 con ACM anti-NSP3; carril 5, co-precipitación de NSP1 y NSP3 con ACM anti-NSP3; carril 6, inmunoprecipitación de NSP1 con ACM anti-NSP3; carril 7, proteína NSP1 sin inmunoprecipitar. Se señala con un triángulo sólido a NSP1 co-inmunoprecipitada con el ACM anti-NSP3 y con un triángulo vacío su ausencia cuando no está presente NSP3 en el ensayo.

4.3 Co-precipitación de NSP1 usando suero hiperinmune anti-NSP3 de rotavirus SA-11

Se analizó la capacidad de un suero hiperinmune anti-NSP3 producido contra NSP3 del rotavirus SA-11 para inmunoprecipitar a NSP3 de rotavirus YM, ya que el suero producido contra NSP3 del rotavirus YM presentaba baja capacidad de inmunoprecipitación de NSP3. Inicialmente se usó porque no se contaba con el suero anti-NSP3 de SA11 al comenzar este trabajo. Los resultados obtenidos muestran que suero hiperinmune anti-NSP3 de rotavirus SA-11 precipita una mayor cantidad de NSP3 que el suero hiperinmune anti-NSP3 de rotavirus YM e inclusive precipita una mayor cantidad de NSP3 que el ACM PNS31, como se observa en la Figura 25, por lo que se decidió usarlo en un ensayo de co-precipitación.

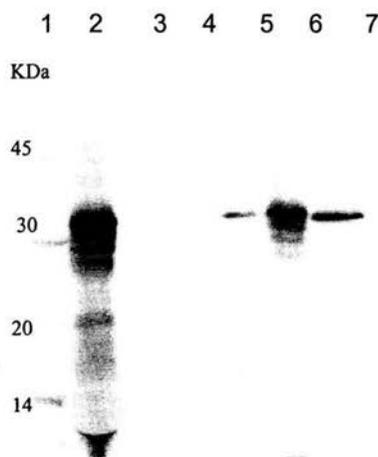


Figura 25. Inmunoprecipitación de NSP3 con suero hiperinmune de conejo anti-NSP3 de rotavirus SA-11 en condiciones de astringencia media. Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, proteína NSP3 sin inmunoprecipitar; carril 3, inmunoprecipitación de NSP3 con el suero preinmune de conejo; carril 4, inmunoprecipitación de NSP3 con anticuerpo anti VP6 1E11 (control negativo); carril 5, inmunoprecipitación de NSP3 con suero hiperinmune de ratón anti-NSP3 de YM; carril 6, inmunoprecipitación de NSP3 con suero hiperinmune de conejo anti-NSP3 de SA-11; carril 7, inmunoprecipitación de NSP3 con el ACM anti-NSP3 PNS31.

En la co-precipitación de las proteínas virales usando el suero hiperinmune de conejo anti-NSP3 de rotavirus SA-11 se observó, como en el ensayo previo, una alta eficiencia para precipitar a NSP3 y se detectó la co-inmunoprecipitación de NSP1 (Figura 26, carriles 5 y 6) claramente discernible por comparación con el control que solo contenía a NSP1 (carril 7), sin embargo el nivel de NSP1 co-precipitada es bajo y comparable con la cantidad de NSP1 inmunoprecipitada con el suero hiperinmune anterior o con la del ACM PNS31.

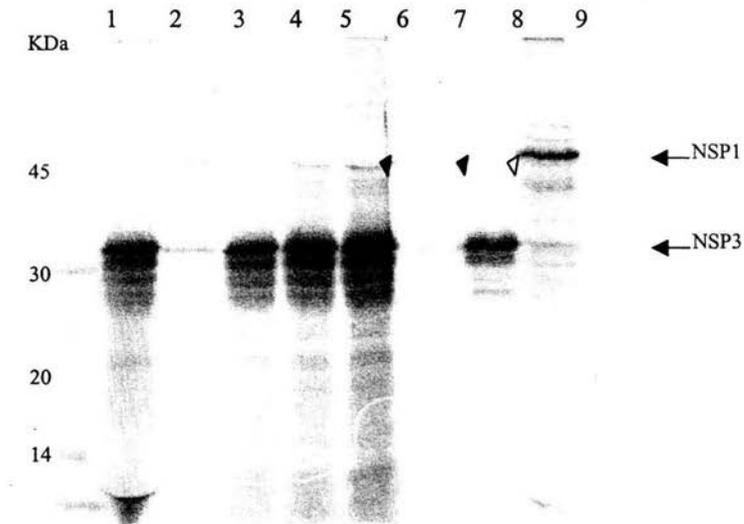


Figura 26. Co-precipitación de NSP3 y NSP1 del rotavirus YM con suero hiperinmune de conejo anti-NSP3 de SA11 en condiciones de baja astringencia. Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, NSP3 sin inmunoprecipitar; carril 3, co-precipitación de NSP1 y NSP3 con anticuerpo anti-VP6 255/60 (control negativo); carril 4, inmunoprecipitación de NSP3 con suero hiperinmune anti-NSP3 de SA11; carriles 5 y 6, co-precipitación de NSP3 y NSP1 con suero hiperinmune anti-NSP3 de SA11; carril 7, inmunoprecipitación de NSP1 con suero hiperinmune anti-NSP3 de SA11; carril 8, inmunoprecipitación de NSP3 con ACM anti-NSP3; carril 9, NSP1 sin inmunoprecipitar. Se señala con triángulos sólidos a NSP1 co-inmunoprecipitada con anticuerpos anti-NSP3 y con un triángulo vacío su ausencia cuando no está presente NSP3 en el ensayo.

Los datos de las co-inmunoprecipitaciones usando anticuerpos anti-NSP3 se analizaron por densitometría, encontrando que se inmunoprecipitó el 3.5 % de NSP1 total usada en los ensayos (Figura 27) en contraste con el 87% que se precipitó de NSP3 en el mismo carril. El análisis densitométrico se realizó con el promedio de los resultados mostrados en las figuras .

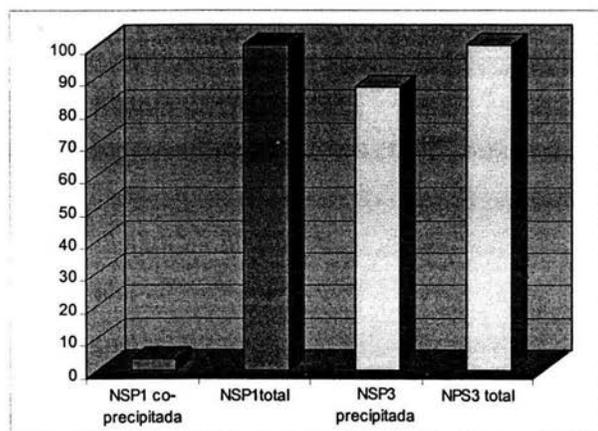


Figura 27.Representación grafica de la cantidad de NSP1 y NSP3 inmunoprecipitadas usando anticuerpos anti-NSP3.

4.4 Co-precipitación de NSP3 usando suero hiperinmune anti-histidinas

A pesar de las diferentes modificaciones al ensayo de co-precipitación no se obtuvo una señal importante de la interacción entre NSP3 y NSP1 por lo que se cambió el enfoque usado anteriormente y se decidió inmunoprecipitar a la proteína NSP1, sin embargo en el laboratorio no se cuenta con un anticuerpo anti-NSP1 por lo que se expreso a NSP1 a partir una construcción en la que el marco abierto de lectura del gene de NSP1 del rotavirus RRV se insertó en el plásmido vector pET28. Este sistema incorpora al extremo carboxilo de la proteína de interés una serie de seis histidinas, y en el otro extremo del gene de

interés incorpora al promotor de la polimerasa T7 lo que permite su expresión *in vitro* y el uso de un anticuerpo anti-histidinas para inmunoprecipitar a NSP1. En el laboratorio se contaba con esta construcción (anexo d), por lo que usando el sistema de transcripción y traducción acoplada para productos de PCR se obtuvo una proteína a la que se le nombro NSP1-His6. La proteína expresada se analizó por electroforesis usando un marcador de peso molecular marcado con ^{14}C , y se encontro que este es ligeramente mayor que NSP1 del rotavirus YM. Por tratarse de NSP1 derivadas de dos cepas virales distintas (RRV y YM) no es claro si la diferencia de peso molecular se debe a la cepa viral o a la adición de 6 histidinas a NSP1 de RRV (Figura 28).

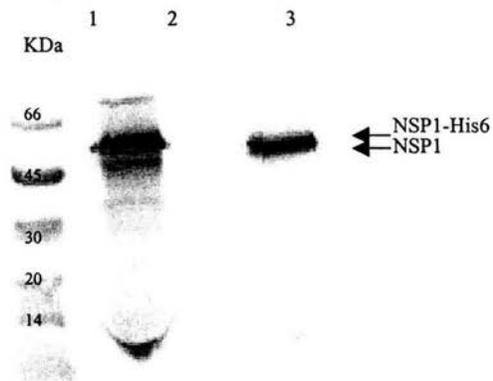


Figura 28. Expresión de NSP1-His6 del rotavirus RRV y NSP1 del rotavirus YM. Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, NSP1-His6 del rotavirus RRV expresada *in vitro*; carril 3, NSP1 del rotavirus YM expresada *in vitro*.

La proteína NSP1-His6 se inmunoprecipitó en los ensayos de co-precipitación en condiciones de astringencia media con un anticuerpo comercial anti-histidinas, el cual precipitó eficientemente a NSP1 aunque también se observó un ligero fondo de otras proteínas con un peso molecular menor a NSP1 (Figura 29, carril 4). En la co-inmunoprecipitación de NSP3 con el suero anti-histidinas en presencia de NSP1-His6 se observó la co-precipitación de NSP3 (carril 5) en contraste con la ausencia de NSP3 cuando no esta presente NSP1 (carril 6). Sin embargo nuevamente la cantidad de proteína co-precipitada (en este caso NSP3) es muy poca con respecto a la cantidad de NSP1 precipitada en el ensayo y comparado con lo precipitado por el anticuerpo anti-NSP3 usado como control (carril 7).

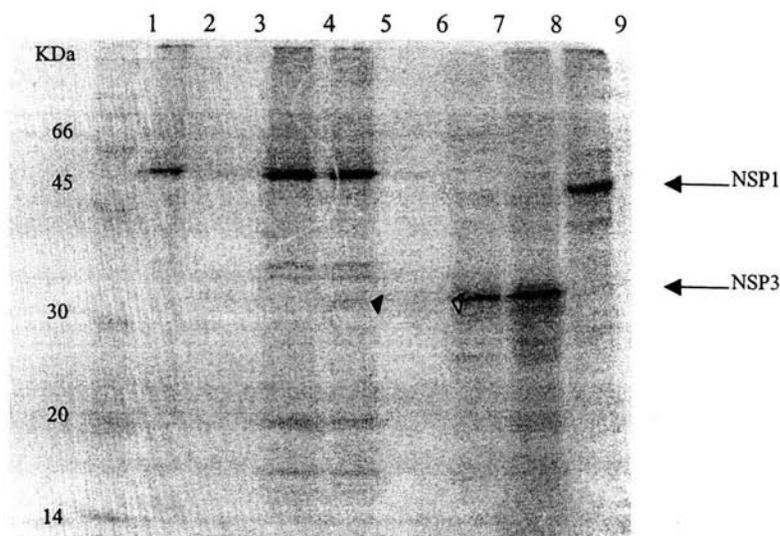


Figura 29. Co-precipitación de NSP3 y NSP1 con el anticuerpo policlonal anti-histidinas en condiciones de astringencia media. Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, NSP1 sin inmunoprecipitar; carril 3, inmunoprecipitación de NSP3 y NSP1 con anti-VP6 1E11 (control negativo); carril 4, inmunoprecipitación de NSP1-His6 con anticuerpo anti-His; carril 5, co-inmunoprecipitación de NSP3 y NSP1 con anticuerpo anti-His; carril 6, inmunoprecipitación de NSP3 con anticuerpo anti-His; carril 7, inmunoprecipitación de NSP3 con ACM PNS31 anti-NSP3; carril 8, NSP3 sin inmunoprecipitar; carril 9, NSP1 sin inmunoprecipitar

Los resultados de la co-inmunoprecipitación de NSP3 con un anticuerpo que inmunoprecipita a NSP1 sugieren fuertemente la interacción entre NSP1 y NSP3, sin embargo contrario a lo que se esperaba la fracción de NSP3 inmunoprecipitada fue de 2.6% (Figura 30) en comparación con el 67 % de NSP1-His6 que es capaz de precipitar el anticuerpo anti-His. Estos datos representaron un resultado sorpresivo ya que el anticuerpo anti-NSP3 (grafica R1) tampoco fue capaz de co-precipitar un porcentaje alto de NSP1. Los resultados sugieren que la cantidad de proteína que se co-precipita en ambos casos no es consecuencia de la estequiometría de la reacción, que debiera ser igual al ser determinada con cualquiera de los dos anticuerpos, y el bajo porcentaje de co-precipitación proteica se debe a alguna otra característica o condición del ensayo.

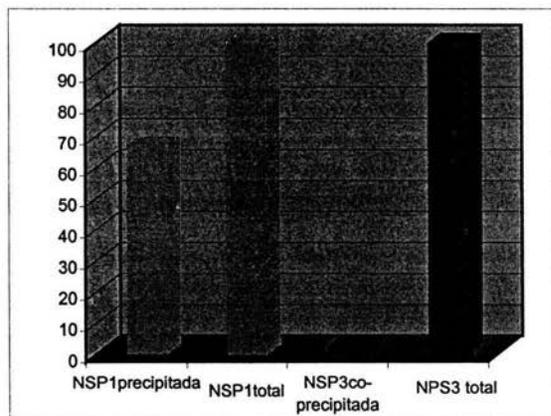


Figura 30. Representación grafica de la cantidad de NSP3 y NSP1 precipitadas con un anticuerpo anti histidinas.

5. Entrecruzamiento químico de NSP3 y NSP1

Con base en los resultados anteriores se decidió tratar de estabilizar la interacción de NSP1 y NSP3 con el fin de aumentar la sensibilidad del ensayo

por lo que se realizaron ensayos de entrecruzamiento químico usando glutaraldehído como agente entrecruzante. El primer ensayo se realizó usando glutaraldehído al 0.15 % y las muestras se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% obteniéndose agregados que se retuvieron en la parte superior del gel; también se observaron 2 bandas tenues de compuestos minoritarios que migraron aproximadamente a 30 y 16 KDa, ninguno de los cuales corresponde al tamaño de NSP1 y NSP3.

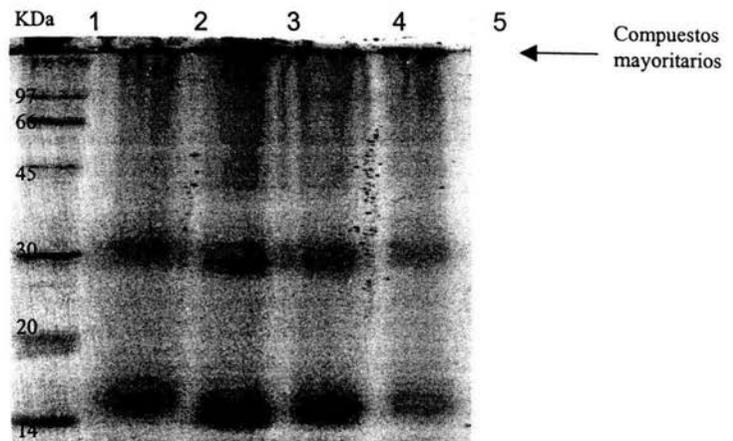


Figura 31. Ensayos de entrecruzamiento químico de las proteínas NSP1 y NSP3 de rotavirus YM usando glutaraldehído 0.15 %. Carril 1, marcador de peso molecular; tratamiento con glutaraldehído 0.15 % de: NSP1 (carril 2); NSP1 + NSP3 (carriles 3 y 4); NSP3 (carril 5).

Se modificaron las condiciones del ensayo de entrecruzamiento químico disminuyendo tanto la concentración del agente entrecruzante como la de las muestras para favorecer la formación de los compuestos deseados. Sin embargo, nuevamente el análisis muestra la formación de complejos, los cuales son retenidos en la parte superior del gel (Figura 32) y adicionalmente se observaron, como en la figura R16, una pequeña cantidad de compuestos

minoritarios de bajo peso molecular. El peso molecular de los agregados es superior a 200 KDa ya que las proteínas de menor peso molecular pueden ser resueltas en las condiciones de análisis usadas.

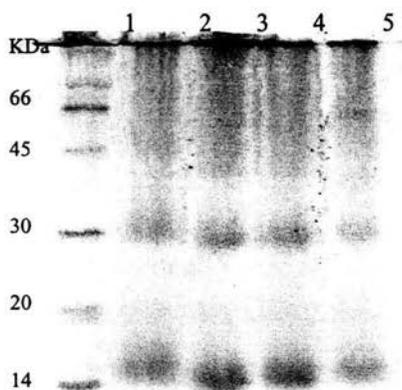


Figura 32. Ensayos de entrecruzamiento químico usando glutaraldehído 0.015 %. Carril 1, marcador de peso molecular. En presencia de glutaraldehído: carril 2, NSP1; carriles 3 y 4, NSP1 + NSP3; carril 5, NSP3.

6. Análisis del estado oligomérico de NSP3 y NSP1

Una de las posibles explicaciones para la formación de agregados tan grandes en presencia de glutaraldehído es que las proteínas se encuentren en estados oligoméricos superiores a los reportados en la literatura. Por lo tanto se analizó el estado oligomérico de las proteínas por electroforesis en condiciones nativas. Para obtener el peso molecular aproximado de NSP1 y NSP3 se analizó la migración electroforética de las proteínas usando geles de poliacrilamida de varias concentraciones y se midieron las distancias de migración electroforética las cuales se compararon con las obtenidas por un conjunto de marcadores de peso molecular conocido que fueron analizados en las mismas condiciones que las proteínas de interés (Figura 33).

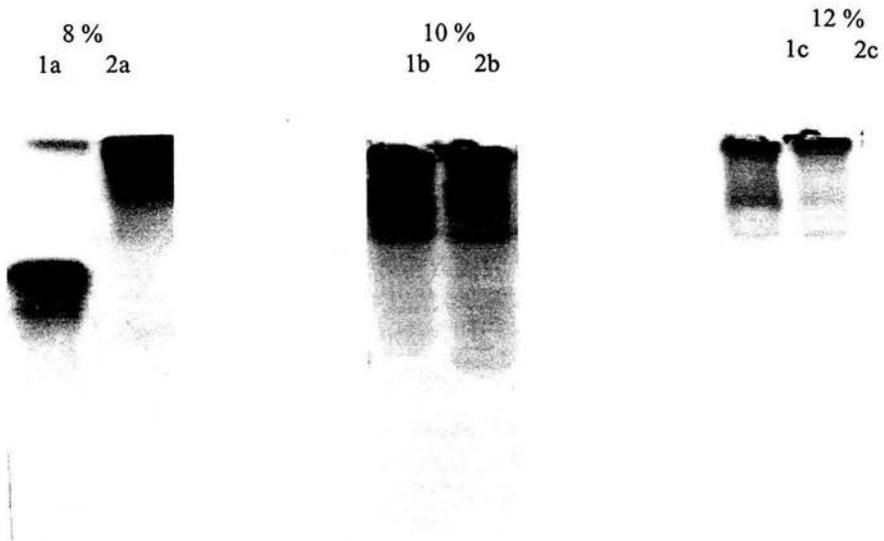


Figura 33. Determinación del peso molecular de las proteínas NSP3 y NSP1 en geles de poliacrilamida nativos al 8 %,10 % y 12 %. En el carril 1a, NSP3; Carril 2a, NSP1; carril 1b, NSP3; carril 2b, NSP1; carril 1c, NSP3; carril 2c, NSP1.

En la Figura 34 se interpolaron los valores correspondientes para las proteínas NSP1 y NSP3 en relación a la migración de los marcadores de peso molecular en condiciones nativas (que no se observan en la Figura 33, por no ser radioactivas). El valor aproximado para NSP3 fue de 100 KDa mientras que en el caso de NSP1 no se determinó su peso molecular porque los agregados no entraron al gel en ninguna concentración usada de poliacrilamida, lo que indica que estos agregados poseen un peso molecular mayor a 200 KDa ya que proteínas con menor peso molecular son resueltas en las condiciones de análisis usadas.

Determinación del PM de NSP3 y NSP1

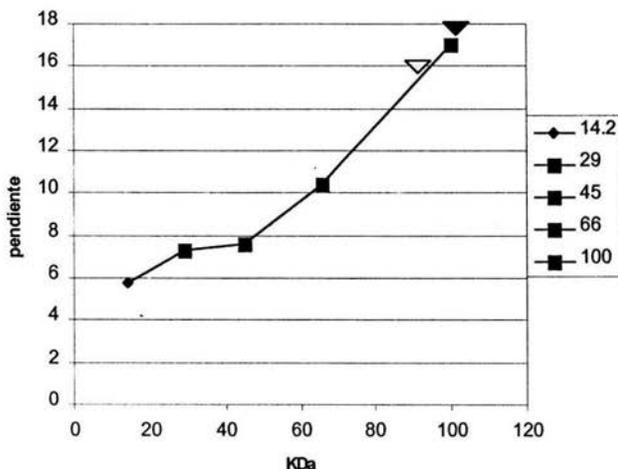


Figura 34. Gráfica para determinar el peso molecular de las proteínas NSP1 (▼) y NSP3 (◁) por electroforesis en condiciones nativas. Las proteínas usadas como marcadores fueron: α -lactoalbúmina serica bovina (14.2 KDa), anhidrasa carbónica (29 KDa), albúmina obtenido del huevo de pollo (45 KDa), albúmina serica bovina (66 KDa para monómero y 132 KDa para dímero) y ureasa (272 para trímero y 545 para hexámero).

La existencia de estados oligoméricos superiores a dímero de al menos NSP1, y probablemente de NSP3 podría afectar la interacción proteica, por lo que se decidió tratar de disminuir el estado oligomérico de estas proteínas. Se usaron los agentes tensoactivos (Tritron X-100 y Nonidet P40) para determinar si se trata de interacciones hidrofóbicas entre los monómeros. También se usaron agentes reductores (β -mercaptoetanol y DTT) para determinar si las interacciones entre monómeros son covalentes del tipo puentes de disulfuro.

Analizando el efecto de estos agentes tensoactivos y reductores, por electroforesis en condiciones nativas se observó que, en el caso de NSP3, las sustancias tensoactivas y las reductoras no afectaron el estado oligomérico de la

proteína, aunque el agente reductor β -mercaptoetanol ocasionó que parte de la proteína entrara al gel, sugiriendo la existencia de agregados proteicos heterogéneos, causados por puentes disulfuro intramoleculares. En el caso de NSP1 ninguna de las condiciones usadas afectó el estado multimérico de la proteína como se observa en el gel (Figura 35).

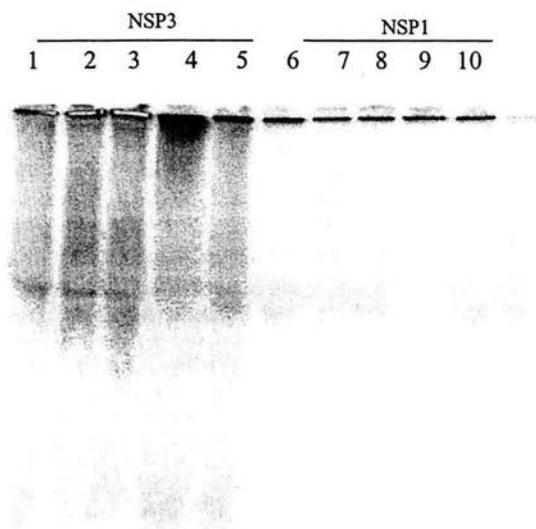


Figura 35. Electroforesis en gel de acrilamida al 12 % en condiciones nativas para determinar el efecto de agentes reductores y tensoactivos sobre el estado oligomérico de NSP3 y NSP1. Carril 1, NSP3; carriles 2 al 5, NSP3 en presencia de: buffer A conteniendo Nonidep P40 1% y 1% deoxicolato de sodio (carril 2), buffer B conteniendo 1% Triton X-100, 1% deoxicolato de sodio y 0.1 % SDS (carril 3), β -ME 1% (carril 4), DTT 10mM (carril 5). Carril 6, NSP1; carriles 7 al 10, NSP1 en presencia de: buffer A (carril 7), buffer B (carril 8), β -ME 1 % (carril 9), DTT 10 mM (carril 10).

Las condiciones analizadas no afectaron significativamente el estado oligomérico o de agregación de las proteínas por lo que se probaron mayores concentraciones de los agentes reductores y se usó otro agente tensoactivo (SDS). Los resultados analizados por electroforesis en condiciones nativas

muestran que NSP3 "entra en el gel" cuando se encuentra en presencia de β -mercaptoetanol (β -ME) al 5%. En el caso de NSP1 también el β -mercaptoetanol causó que la proteína entrara ligeramente al gel (Figura 36). Estos resultados sugieren que tanto NSP3 como NSP1 presentan estados oligoméricos superiores o agregados heterogéneos que son parcialmente resueltos con el uso de un agente reductor en alta concentración.

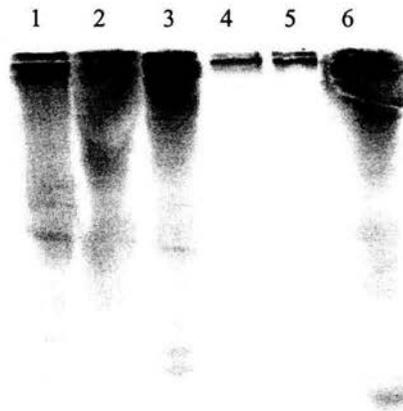


Figura 36. Efecto de agentes reductores y agentes tensoactivos. Carril 1, NSP3; carril 2, NSP3 en presencia de SDS 0.3%; carril 3, NSP3 en presencia de BME 5%; carril 4, NSP1; carril 5, NSP1 en presencia de SDS 0.3%; carril 6, NSP1 en presencia de BME 5%.

VII. ANALISIS DE RESULTADOS

La proteína NSP1 de rotavirus podría participar en la modulación de la respuesta del huésped ya que interacciona con el factor transcripcional IRF-3, el cual juega un papel importante en la modulación de los estados antivirales en la célula. Por otro lado, NSP3 tiene un papel relevante en la infección viral ya que inhibe la síntesis de proteínas celulares.

El modelo de replicación viral de rotavirus aceptado en los últimos años, que esta basado en la distribución de las proteínas virales y su interacción con otras proteínas virales y el ARNm viral en sistemas *in vitro*, plantea que el ARNm viral se produce fuera de los viroplasmos y es transportado hacia estas estructuras por una o varias proteínas que se unen al ARNm viral. Entre las proteínas que interaccionan con el ARNm viral están NSP1 y NSP3. Estas proteínas además de interaccionar con los extremos 5' y 3' el ARNm viral respectivamente, se distribuyen en el citoplasma por lo que, se ha postulado que ambas participan en el proceso de "canalización" de los ARNm virales hacia los viroplasmos.

Esta "canalización" podría ser mediada por NSP1 y NSP3 de manera individual o por una interacción entre ellas. La interacción ha sido sugerida por varios estudios. El principal antecedente de la interacción fue aportado por Gonzáles y colaboradores (1997). Este grupo encontró que las construcciones NSP1-dominio de activación y NSP3-dominio de unión a ADN presentaban interacción; sin embargo, no sucedió lo mismo con las construcciones inversas (NSP1-dominio de unión a ADN y NSP3-dominio de activación) por lo que los resultados de la interacción no fueron concluyentes. Los mismos autores analizaron la interacción de construcciones truncadas de NSP1 con NSP3 y viceversa pero no se demostró la interacción de ninguna de ellas, sugiriendo que si ésta existe, es altamente dependiente de la conformación. No fue posible determinar los dominios de la proteína que participan en la interacción con esa metodología y es necesario que la interacción sea estudiada usando otra metodología.

Entre las diversas metodologías para estudiar las interacciones proteicas, en el presente estudio analizamos la interacción usando la co-precipitación *in vitro*. Esta técnica no detecta interacciones de baja afinidad o transitorias, que pueden existir en la célula en un estado de equilibrio dinámico, lo que permite determinar si dos proteínas interactúan en forma específica, minimizando la posibilidad de obtener resultados falsos positivos. La co-precipitación *in vitro* también permitió estudiar la interacción en ausencia de elementos que pudieran afectar el estudio. La presencia del ARNm viral podría favorecer la formación del complejo tripartito NSP3/ARNm/NSP1 generando falsos positivos ya que ambas proteínas interactúan con el. La metodología también permite descartar si el factor IRF-3 participa en la interacción como fue sugerido por Groff *et al.*, 2003.

Para el estudio de la interacción NSP3/NSP1, estas proteínas se expresaron *in vitro*. En ambos casos se obtuvo a la proteína de interés junto con proteínas de menor peso molecular, producidas probablemente por terminación temprana en la síntesis o por degradación con proteasas. La presencia de estas proteínas, no afectó nuestro estudio ya que tanto NSP1 como NSP3 fueron los productos mayoritarios en la expresión, adicionalmente los resultados se analizaron por electroforesis, por lo que se determinó con precisión si la co-precipitación correspondía a la proteína de interés.

En la expresión *in vitro* de las proteínas virales se obtuvo una mayor cantidad de NSP3 que de NSP1. Esto coincide con lo observado en la infección viral, donde la cantidad de NSP3 es alrededor de 3 veces más que la de NSP1 (McCrae *et al.*, 1989). Estas diferencias entre las cantidades de proteínas producidas *in vitro* sugieren un mecanismo de regulación en la expresión proteica similar al que ocurre en células infectadas.

Los mecanismos que regulan la expresión de los genes virales no se conocen en su totalidad. Se ha postulado que existen secuencias ubicadas en las regiones no traducibles (RNT) de todos los genes virales que participan en la regulación ya sea inhibiendo o promoviendo la expresión de los mismos. La participación de estas secuencias se ha demostrado en la expresión de VP6, la cual es afectada por una secuencia "enhancer" en el extremo 3' de la

RNT (Yang *et al.*, 2004). Las proteínas producidas en este estudio no contienen las RNT (solo se clono el marco abierto de lectura) lo que sugiere que los elementos reguladores de la expresión de ambas proteínas, no solo podrían estar dentro de las RNT sino también dentro del marco abierto de lectura.

Estos resultados no permiten afirmar que las RNT no participan en la regulación proteica de NSP1 y NSP3 durante la infección viral, ya que no es posible interpolar los datos obtenidos en este sistema con lo que ocurre en la infección viral.

En los ensayos de co-precipitación de NSP1 y NSP3 usando el suero hiperinmune anti-NSP3 de rotavirus se encontro que una pequeña cantidad de NSP1 co-inmunoprecipita junto con NSP3, lo que sugiere que NSP1 y NSP3 interaccionan de manera directa sin requerir al ARNm viral y/o IRF-3 u otro factor viral o celular. Los datos obtenidos al co-precipitar a NSP3 usando un anticuerpo anti-histidinas que interacciona con NSP1 fusionada a una cola de histidinas también sugieren que NSP1 y NSP3 interaccionan.

La cantidad de NSP1 co-precipitada usando el suero hiperinmune anti-NSP3 en condiciones fue mínima, lo que no permite asegurar que las NSP1 y NSP3 interaccionan. Sin embargo, esta cantidad fue detectada en condiciones de alta astringencia en los lavados, lo que sugiere fuertemente que la interacción se presenta.

Como la cantidad de proteína inmunoprecipitada podría ser consecuencia de que solo una fracción de las proteínas se encuentre soluble y por lo tanto solo esta fracción pueda participar en la interacción, se analizo la solubilidad de las proteínas en los lisados. Ambas proteínas se ubican en la fracción soluble de los lisados, lo que sugiere que ambas proteínas están disponibles para interaccionar.

En la búsqueda de condiciones que aumentaran la sensibilidad en la determinación de la interacción entre NSP1 y NSP3 se cambió el suero hiperinmune de ratón anti-NSP3 del rotavirus YM por otro suero hiperinmune de conejo anti-NSP3 del rotavirus SA-11 y por un ACM anti NSP3 del rotavirus YM. Sin embargo, aún usando anticuerpos con excelente capacidad

para inmunoprecipitar a NSP3 no se logró aumentar la cantidad de NSP1 inmunoprecipitada.

La cantidad de NSP1 inmunoprecipitada por los distintos sueros hiperinmunes y el ACM anti-NSP3 fue constante, por lo que se considero la posibilidad de que la cantidad de proteína inmunoprecipitada refleja una relación estequiométrica asimétrica, donde se requieran numerosas moléculas de NSP3 para interactuar con NSP1. Sin embargo, cuando se co-precipitó a NSP3 usando un anticuerpo anti-His y se encontró que la cantidad de NSP3 fue igual de baja a la de NSP1 co-precipitada por el anticuerpo anti-NSP3. Estos datos indican que la cantidad de proteína co-precipitada no refleja ninguna relación estequiométrica asimétrica, sino que se debe a factores desconocidos.

La cantidad de proteína co-precipitada no permite concluir que las proteínas interactúan ni identificar el dominio de unión a NSP1 en NSP3, ya que la señal obtenida podría arrojar resultados falsos negativos. Sin embargo, el uso del ACM anti-NSP3 permitió hacer inferencias sobre el posible sitio de interacción de NSP3 con NSP1. El anticuerpo monoclonal reconoce a los últimos 107 aminoácidos de NSP3 (Vidal *et al.*, datos sin publicar). Considerando que el anticuerpo con un peso de 150 KDa es más grande que NSP3 (34 KDa) el impedimento estérico del anticuerpo unido a NSP3 en su extremo carboxilo difícilmente permitiría su interacción con NSP1. Como el ACM no interfirió con la cantidad de proteína precipitada, es probable que si NSP3 interactúa con NSP1 lo haga a través del extremo amino terminal o en la parte central de NSP3.

Dados los resultados obtenidos, se exploró la interacción por entrecruzamiento químico. Sin embargo, en los ensayos de entrecruzamiento químico, todas las muestras fueron retenidas en la parte superior del gel, por lo que no fue posible determinar la interacción por este método.

La formación de complejos de alto peso molecular en los ensayos de entrecruzamiento, sugirió que NSP1 y/o NSP3 podrían formar oligómeros de alto peso molecular. Lo anterior se corroboró por electroforesis en condiciones nativas, en donde se observó que NSP3 tiene un peso molecular aproximado

de 100 KDa. Este resultado es similar al obtenido por Mattion *et al.*, (1992) cuando determino el estado oligomérico de NSP3 recombinante producida en células de insecto en ausencia de agentes reductores. Sin embargo, Mattion sugirió que NSP3 es un dímero y que el peso molecular obtenido es producto de interacciones intermoleculares mediadas por puentes disulfuro. La naturaleza dimerica de la proteína fue confirmada cuando se resolvió la estructura tridimensional de los fragmentos amino y carboxilo de NSP3 por cristalización (Deo *et al.*, 2001, Groft *et al.*, 2002). Sobre la base de estos antecedentes y considerando que el extremo carboxilo de NSP3 presenta una forma alargada como de bastón, proponemos que NSP3 con un peso molecular aparente de 100 KDa es un dímero y el retraso en su migración en geles nativos se debe a la forma del extremo carboxilo.

En el caso de NSP1 no fue posible determinar su estado oligomérico, sin embargo, esta proteína no es monomérica. El peso molecular del oligómero es mayor a 200 KDa que es la capacidad de resolución que tienen las concentraciones de poliacrilamida usadas. Por lo que NSP1 puede tener un arreglo tetramérico o de mayor número de unidades.

No existen estudios previos sobre el estado oligomérico de NSP1, sin embargo el estado oligomérico de la proteína disminuyó en presencia del agente reductor β -ME, lo que sugiere que existen interacciones intermoleculares mediadas por puentes disulfuro. No es posible descartar que estos complejos de NSP1 solamente existan *in vitro* como un artefacto debido a las condiciones reductoras usadas, las cuales son distintas a las celulares, lo que podría permitir la formación de puentes disulfuro intermoleculares.

Después de analizar distintos factores que pudieran afectar la interacción, creemos que el estado oligomérico de las proteínas virales, en especial de NSP1 probablemente es lo que impide que NSP1 y NSP3 se encuentren "disponibles" para interactuar entre sí. Es decir, la formación de los grandes complejos oligoméricos o agregados de NSP1 podrían impedir la accesibilidad de su dominio de interacción con NSP3. Esto explicaría las bajas cantidades de proteína inmunoprecipitada y que los datos de co-precipitación no se ajusten a una relación estequiométrica definida en la interacción.

Los datos obtenidos, no permiten concluir si las proteínas interactúan, por lo que es necesario abordar su estudio usando otro tipo de metodología. Los resultados obtenidos en los estudios de la interacción, sugieren que esta es altamente dependiente de la conformación y que el estado oligomérico de las proteínas parece ser importante, por lo que proponemos el estudio de la interacción por fluorescencia de transferencia de energía por resonancia (FRET por sus siglas en inglés). Este método se basa en fusionar un fluoróforo distinto a cada proteína estudiada, en donde la excitación de uno de ellos (donador de electrones de alta energía) permite la transferencia de energía del otro fluoróforo que funciona como aceptor de electrones de baja energía, si se encuentra a menos de 100 Å, lo que ocasiona que se emita un fotón. Este método permite la detección de proteínas en tiempo real y en células vivas a través de microscopía de fluorescencia.

Del posible papel que la interacción juega en la infección y su participación en la replicación viral o en la traducción de las proteínas virales no tenemos datos.

Aunque se ha planteado que estas proteínas participan en la canalización del ARNm hacia los viroplasmos, estudios recientes basados en el uso de ARN de interferencia y datos de la síntesis localizada del ARNm viral apuntan que el ARNm viral es sintetizado *in situ* en los viroplasmos, por lo que no sería necesaria la "canalización" a estas inclusiones. (Silvestri *et al.*, 2004).

En este modelo, se ha planteado que después de la entrada del virus a la célula y la pérdida de la capa externa de la partícula viral, se sintetiza el ARNm viral, el cual es incorporado a los polisomas para producir las proteínas virales. Algunas de las partículas bicapa, sirven como puntos de acumulación de las proteínas sintetizadas, y estas por un mecanismo desconocido, son incorporadas a los viroplasmos. Los ARNm producidos por las partículas bicapa en las inclusiones son capturados por una o más proteínas que se unen a ellos y estos sirven como fuente para la replicación del genoma viral. Según este modelo, NSP1 y NSP3 no podrían participar en la replicación viral ya que la localización de ambas proteínas no co-localiza con los sitios de replicación viral.

Se desconoce si NSP1 participa en la traducción viral, contrario a NSP3, la cual tiene un papel indispensable al "secuestrar" la maquinaria celular de traducción. Nosotros proponemos, en base a la función de NSP3, que NSP1 modula la función de NSP3 en la traducción. Sin embargo, para entender el papel de la posible interacción entre estas proteínas, es necesario conocer las funciones de ambas.

Durante la escritura de este trabajo, Barro y Patton (2004) han propuesto que NSP1 promueve la dispersión del virus de célula a célula. Esta función no significa que la proteína no participe en otros procesos, como lo sugiere la capacidad de interacción de la proteína con ARNm viral en un sistema *in vitro*. (Brottier *et al.*, 1992).

VIII. CONCLUSIONES

A pesar del trabajo realizado, no fue posible demostrar la interacción de las proteínas NSP3 y NSP1 *in vitro*. Los resultados obtenidos en el estudio sugieren que NSP1 y NSP3 interactúan, por lo que se requiere abordar el estudio de la interacción con otras metodologías.

XIX. REFERENCIAS

1. **Angel J, Franco MA, Greenberg HB, Bass D** (1999) Lack of a role for type I and type II interferons in the resolution of rotavirus-induced diarrhea and infection in mice, *J Interferon Cytokine Res* **19**(6):655-9
2. **Arias C, Guerrero C, Mendez E, Zárate S, Isa P, Espinza R, Romero P, Lopez S** (2001) Early events of rotavirus infection: the search for the receptor (s), p 47-63 in M.K. Estes and U. Desselberger, *Gastroenteritis virus*, John Wiley and Sons, New York, N.Y.
3. **Ausubel F, Brent R, Kingston ER, More DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K** (eds) 1994 *Current protocols in Molecular biology*. John Wiley and Sons Inc. USA. Col 1-4
4. **Braganca J, Civas A** (1998) Type I interferon gene expression: differential expression of IFN-A genes induced by viruses and double-stranded RNA, *Biochimie*, **80**(8-9):673-87
5. **Bern C, Matines J, Zoysa I, Glass R** (1992) The magnitude of the global problem of diarrhea disease: A ten years up-date. *Bull World health Organ.* **70**:705-714
6. **Bishop R, Davinson G, Holmes H, Ruck B** (1973) Virus particle in epithelial cell of duodenal mucosa from children with non-acute gastroenteritis. *Lancet*: 1281-1283
7. **Boccia D, Stoffi I, Lana S, Moro M** (2001) Nosocomial necrotizing enterocolitis outbreaks: epidemiology and control measures, *Eur J Pediatr* **160**(6): 385-91. Review
8. **Boshuizen J, Reimerink J, Korteland-van M, Ham V, Koopmans M, Buller H, Dekker J, Einerhand A** (2003) Changes in Small Intestinal Homeostasis Morphology, and Gene Expression during Rotavirus Infection of Infant Mice. *J. Virology* **77**:13005-13016.
9. **Both GW, Bellamy AR, Siegman LJ** (1984) Nucleotide sequence of the dsRNA genomic segment 7 of simian rotaviruses, *Nucleic Acid Res* **12**:1621-1626
10. **Brandt C, Kim H, Rodriguez W**, (1982) Rotavirus gastroenteritis and weather. *J Clin Microbiol.* **16**:478-482
11. **Bremont M, Charpilienne A, Chabanne D, Cohen J** (1987) Nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding the nonstructural protein NCP2 of bovine rotavirus, *Virology* **161**:138-144
12. **Bremont M, Chabanne-Vautherot, Cohen J** (1993) Sequence analysis of three nonstructural proteins of a porcine group C (Cowen strain). *Arch Virol.* **130**: 85-92
13. **Bridger J, Michel W, Adamson J Howard C** (1998) Determinants of rotavirus host range restriction- A heterologous Bovine NSP1 gene does not Affect Replication Kinetics in the Pig. *Virology* **245**:47-52
14. **Broome R, Vo P, Ward R, Clark H, Greenberg H** (1993) Murine rotavirus genes encoding outer capsid proteins VP4 and VP7 are not major determinants of host range restriction and virulence. *J Virol* **67**: 2448-2455

15. **Brottier P, Nandi P, Bremont M, Cohen J.** (1992) Bovine rotavirus segment 5 protein expressed in the baculovirus system interacts with zinc and RNA, *J. Gen. Virol.* **73**:1931-1938
16. **Brown K, Offit P.** (1998) Rotavirus specific proteins are detected in murine macrophages in both intestinal and extraintestinal lymphoid tissues. *Microb. Pathog.* **24**:327-331
17. **Ciarlet M, Estes M, Barone C, Raming R, Conner M** (1998) Analysis of host range restriction determinants in the rabbit model: comparison of homologous and heterologous rotavirus infections. *J. Virol* **72**:2341-2351
18. **Ciarlet M, Estes M** (2001) Interactions between rotavirus and gastrointestinal cell. *Current Opinion in Microbiology* **4**: 435-441
19. **Clark S, Spendlove R, Barnett B** (1980) Role of two particles type in bovine rotavirus morphogenesis. *J Virol.* **34**:272-276
20. **Cook S, Glass R, LeBaron C, Ho M** (1990) Global seasonality of rotavirus infection. *Bull World Health* **68**: 171-177
21. **Coulson B, Londrigan S, Lee D** (1997) Rotavirus contains integrin ligand sequences and a disintegrin-like domain that are implicated in virus entry into cells. *Proc Natl Acad Sci.* **94**:5389-5394
22. **Deo R, Rajashankar K, Burley S** (2002) Recognition of the rotavirus mRNA 3' consensus μ by an asymmetric NSP3 homodimer. *Cell* **108**:71-81
23. **Desselberger U** (1996) Genome rearrangements of rotaviruses, *Adv Virus Res.* **46**:69-95
24. **de Villiers FP, Steele AD, Driessen M** (2003) Central nervous system involvement in neonatal rotavirus infection, *Ann Trop Paediatr* **23**(4):309-12
25. **Dharakul T, Riepenhoff-Talty M, Albini B, Ogra L** (1988) Distribution of rotavirus antiG in intestinal lymphoid tissues: potential role in development of the mucosal immune response to rotavirus. *Clin Exp Immunol* **74**:14-19
26. **Dormitzer P, Greenberg H** (1992) Calcium chelation induces a conformational change in recombinant herpes simplex virus-1-expressed rotavirus VP7. *Virology* **189**: 828-832
27. **Dunn S, Cross T, Greenberg H** (1994) Comparison of the rotavirus nonstructural proteins NSP1 (NS53) from different species by sequences analysis and northern blot hybridization *Virology* **203**:178-183
28. **El-Attar L, Dhaliwal W, Howard CR, Bridger JC** (2001) Rotavirus cross-species pathogenicity: molecular characterization of a bovine rotavirus pathogenic for pigs. *Virology* **291**(1):172-82
29. **Ericson B., Graham, Y. Mason B. Estes M.** (1982) Identification, synthesis and modifications of simian rotavirus Sall polypeptides in infected cells. *J Virol.* **42**: 825-839
30. **Fields D, Knipe D, Howley** (2001) *Fields Virology*, Fourth edition, USA, pag 1747-1786
31. **Flewett T, Bryden A, Davies H** (1974) Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. *Lancet* **2**:61-63
32. **Gallegos C, Patton J** (1989) Characterization of rotavirus replication intermediates: a model for the assembly of single-shelled particles. *Virology* **172**:616-627

33. **Glass et al.**, (1997) Rotavirus vaccines at the threshold. *Nat Med* 3:10-15
34. **Goldwater P, Rowland K, Thesinger M, Abbott K, Grieve A, Palombo E, Masendycz P, Wilkinson I, Bear J** (2001) Rotavirus encephalopathy: pathogenesis reviewed. *J Paediatr Child Health* 37(2): 206-9
35. **González M, Torres-Vega A, Lopéz S, Arias C** (1998) In vivo interactions among rotavirus nonstructural proteins. *Arch Virol*, 1998: 981-996
36. **Graham DY, Estes MK** (1985) Proposed working serologic classification system for rotavirus. *Ann Inst Pasteur* 136:5-12
37. **Graham DY, Sackman JW, Estes MK** (1984) Pathogenesis of rotavirus induced diarrhoea. Preliminary studies in miniature swine piglet. *Dig Dis Sci* 29:1028-1035
38. **Granoff A, Webster B** *Encyclopedia of Virology*, second edition Academic Press, USA, 3:1576-1592
39. **Greenberg HB, McAuliffe V, Valdesuso J et al.**, (1983) serological analysis of the subgroup protein of rotavirus, using monoclonal antibodies. *Infec Inmun* 39:91-99
40. **Greenberg H, Shaw D** (1999) Rotaviruses in: *Encyclopedia of virology*, second edition, Academic Press, USA, pag 1576-1592
41. **Groft C, Burley S** (2002) Recognition of eIF4G by Rotavirus NSP3 reveals a Basis for mRNA Circularization. *Molecular Cell* 9:1273-1283
42. **Hadziselimovic F, Just M, Berger R, Frey I, Stalder G** (1984) Rotavirus infection and otitis media. *Infection*. Jul-Aug; 12(4): 296
43. **Hung J, Wen H, Yen M, Chen H, Yan D, Lin L, Lin J, Lin Y, Hsu Y** (2003) Rotavirus gastroenteritis associated with afebrile convulsion in children: clinical analysis of 40 cases. *Chang Gung Med J*. 26(9): 654-9
44. **Hua J, Mansell E, Patton J** (1993) Comparative Analysis of the Rotavirus NS53 Gene: Conservation of Basic and Cysteine-Rich Regions in the protein and Possible Stem-Loop Structure in the RNA. *Virology* 196: 372-378
45. **Hua J, Chen X, Patton J.** (1994) Deletion mapping of the rotavirus metalloprotein NS53 (NSP1): the conserved cysteine-rich region is essential for virus-specific RNA binding. *J. of Virology* 68:3990-4000
46. **Hua J, Patton J** (1994) The carboxyl-half of the rotavirus nonstructural proteins (NSP1) is not required for virus replication. *Virology* 198:567-676
47. **Imai M, Akatani K, Ikegami N and Furuichi Y** (1983) Capped and conserved terminal structures in human rotavirus double stranded RNA segments *J. Fo Virology* 47:125-136
48. **Jayaram H, Estes M, Prasad V.** (2004) Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. *Virus Research* 101: 67-81
49. **Jiang B, Dennehy PH, Spangerberger S, Gentsch JR, Glass RI** (1995) First detection of group C rotavirus in fecal specimens of children with diarrhea in the United States. *J Infect Dis* 172:45-50

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

50. **Johnson M & McCrae M** (1989) Molecular Biology of Rotavirus, VIII. Quantitative Analysis of Regulation of Gene Expression during Viral Replication *J. of Virology*, 2048-2055
51. **Kapikian Z, Yasuhaya H, Chanock M** (2001) Rotavirus in: *Fields Virology*, 4 edition, Lippincott William & Wilkins, USA: 1748-1760.
52. **Kattoura M, Clapp L, Patton J** (1992) The Rotavirus Nonstructural Protein NS35, Possesses RNA-Binding Activity in Vitro and in Vivo. *Virology* **191**:698-708
53. **Kawashima H, Inage Y, Ogihara M, Kashiwagi Y, Takekuma K, Hoshika A, Mori T, Watanabe Y** (2004) Serum and cerebrospinal fluid nitrite/nitrate levels in patients with rotavirus gastroenteritis induced convulsion. *Life Sci. Jan 30*; **74**(11): 1397-405
54. **Kojima K, Taniguchi K and Kobayashi N** (1996) Species-specific and interspecies relatedness of NSP1 sequences in human, porcine, bovine, feline, and equine rotavirus strains *J. Arch. Virol.* **141** (1), 1-12.
55. **Koopmans M, Brow D** (1999) The seasonality and diversity of group A in: *Europe Act Paediatr Suppl* **88**:14-19
56. **Lawton J, Estes M, Prasad B** (1997) Three- dimensional visualization of mRNA release from actively transcribing rotavirus particles. *Nat Struct Biol.* **4**:118-121
57. **Lawton JA, Estes MK, Prasad BV** (2000) Mechanism of genome transcription in segmented dsRNA virus. *Adv Virus Res* **55**:185-229
58. **Li N, Yao Y, Ou Q** (2001) Preliminary investigation of the relationship between liver lesion and relevant factors in young children with rotavirus diarrhea *Zhonghua. Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi.*Mar; **15**(1): 51-4.
59. **Ludert JE, Ruiz MC, Hidalgo C, Liprandi F** (2002) Antibodies to rotavirus outer capsid glycoprotein VP7 neutralize infectivity by inhibiting virion decapsidation, *J Virol*, **76**(13):6643-51
60. **Lui M, Mattion N, Estes M** (1992) Rotavirus VP3 expressed in insect cells possesses guanylyltransferase activity. *Virology* **188** :77-84
61. **Mattion N, Cohen J, Aponte C, Estes M** (1992) Characterization of a oligomerization Domain and RNA-binding properties on rotavirus nonstructural protein NSP34. *Virology* **190**:68-83
62. **Meyer J, Bergman C, Bellamy R** (1989) Interaction of rotavirus cores with the nonstructural glycoprotein NS28, *Virology* **171**:98-107
63. **Michel YM, Poncet D, Piron M, Kean KM, Borman AM** (2000) Cap-Poly (A) synergy in mammalian cell-free extracts. Investigation of the requirements for poly (A)-mediated stimulation of translation initiation, *J Biol Chem.* **275**(41):32268-76
64. **Mitzel D, Weisend C, White M, Hardy M** (2003) Translational regulation of rotavirus gene expression. *J. Of General Virology*, **84**:383-391
65. **Morris A, Estes M** (2001) Microbes and Microbial Toxins: Paradigms for Microbial-Mucosal Interactions, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **208**:G303-G310

66. **Murray C, Lopez A** (1997) Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020:Global Burden of Disease Study *Lancet*, **349**:1436-1442
67. **Musalem C, Espejo RT** (1985) Release of progeny virus from cell infected with simian rotavirus SA11, *J Gen Virol* **66**:2715-2724
68. **Newton K, Meyer J, Bellamy A, Taylor J** (1997) Rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 alters plasma membrane permeability in mammalian cell. *J. Virol.* **71**:9458-9465
69. **Okada J, Kobayashi N, Taniguchi K, Shiomi H** (1999) Functional analysis of the heterologous NSP1 genes in the genetics background of simian rotavirus. *Sall. Arch Virol* **144**: 1439-1449
70. **Padilla-Noriega L, Paniagua O, Guzmán-León S** (2002) Rotavirus Protein NSP3 Shuts Off Host Cell Protein Synthesis. *Virology* **298**:1-7
71. **Parashar U, Humelman E, Bresee S, Millar A, Glass R** (2001) *Abstr. Vaccines Enteric Dis.* p.
72. **Patton J** (1995) Review article: Structure and function of the rotavirus RNA-binding proteins. *Journal of General Virology.* **76**:2633-2644
73. **Patton J, Spencert E** (2000) Genome Replication and Packaging of Segmented Double-Stranded RNA Virus. *Virology* **277**:217-225
74. **Piron M, Delaunay T, Grosclaude J, Poncet D** (1999) Identification of the RNA-binding, Dimerization and eIF4G-Binding Domains of Rotavirus Nonstructural Protein NSP3. *Journal of Virology* **73** (7): 5411-5421
75. **Piron M, Vende P, Cohen J** (1998) Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4GI and evicts the poly-(A) binding protein from eIF4GI. *The EMBO Journal* **17**: 5811-5821
76. **Poncet D, Aponte C, Cohen J** (1993) Rotavirus protein NSP3 is bound to the 3'-end consensus sequence of viral mRNA in infected cells. *J Virol* **67**:3159-3165
77. **Prasad B, Wang G, Clerx J, Chiu W** (1988) Three-dimensional structure of rotavirus. *J. Mol. Biol.* **199**:269-275
78. **Prasad B, Rothnagel R, Zeng C** (1996) Visualization of ordered genomic RNA and localization of transcriptional complexes in rotavirus. *Nature* **66**: 2135-2142
79. **Qian Y, Jiang B, Saif LJ, Kang SY, Ojeh Ck, Green KY** (1991) Molecular analysis of the gene 6 from a porcine group C rotavirus that encode the NS34 equivalent of group A rotavirus
80. **Sachs AB, Wahle E** (1993) Poly (A) tail metabolism and function in eukaryotes, *J Biol Chem* **268**:2295-22958
81. **Sapin C, Colard O, Delmas O, Tessier C, Breton M, Enouf V, Chwetzoff S, Ouanich J, Cohen J, Wolf C, Truenan G.** (2002) Rafts Promote Assembly and Atypical Targeting of a Nonenvelop Virus Rotavirus In Caco-2 cell. *J Virology* **76**:4591-4601

82. **Silvestri L, Taraporewala Z, Patton J** (2004) Rotavirus Replication: Plus-sense templates for Double-Stranded RNA Synthesis Are Made in Viroplasm. *J. of Virology* **78** (14) :7763-7774
83. **Stirzaker S, Whitfield P, Christie D** (1987) Processing of rotavirus glycoprotein VP7: Implications for the retention of the protein in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **105**:2897-2903
84. **Su CQ, Wu YL, Shen HK** (1985) An outbreak of epidemic diarrhea in adults caused by a new rotavirus in Anhui Province of China in the summer of 1983, *J Med Virol* **85**:25-34
85. **Taniguchi K, Kojima K, Urasawa S,** (1996) Non-defective Rotavirus Mutants with an NSP1 Gene Which Has a Deletion of 500 Nucleotides, Including a Cysteine-Rich Zinc Finger Motif- Encoding Region (Nucleotides 156 to 248) or Which Has a Nonsense Codon at Nucleotides 153 to 155. *Journal of Virology* **70**(6): 4125-4130
86. **Tian P, Ball JM, Zeng CQ, Estes MK** (1996) The rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 possesses membrane destabilization activity, *J. Virol* **70**:6973-6981
87. **Valenzuela S, Pizarro J, Sandino A, Vasquez M, Fernandez J, Hernandez O, Patton J, Spencer E** (1991) Photoaffinity labeling of rotavirus VP1 with 8-azido-ATP: identification of viral RNA polymerase, *J. Virol.* **65**:3964-3967
88. **Varani G, Allain FH** (2002) How a rotavirus hijacks the human protein synthesis machinery, *Nat Struct Biol.* **9**(3):158-60
89. **Vente P, Piron M, Castagne N, Poncet D** (2000) Efficient translation of rotavirus RNA requires simultaneous interaction NSP3 with the eukaryotic translation initiation factor eIF4G and the mRNA 3' end, *J Virol* **74**:1431-1441
90. **Ward R, Bernstein D, Young E** (1986) Human rotavirus studies in volunteers: Determination of infectious dose and serological response to infection. *J. Infect Dis* **154**:871-880
91. **Yager M, Dryden K, Olson N, Greenberg H, Baker T** (1994) Three-dimensional structure of rotavirus by cryomicroscopy and image reconstruction. *J Cell Biol* **110** (6): 2133-2144
92. **Yang A, Barro M, Gorziglia M, Patton J** (2004) Translation enhancer in the 3'-untranslated region of rotavirus gene 6 mRNA promotes expression of the major capsid protein VP6. *Arch Virol* (2004) **149**:303-321

ANEXOS

Anexo A. Materiales y reactivos

Material biológico

- Células de riñón de mono, cepa MA104. Esta cepa procedente del laboratorio del Dr. Luis Padilla fue obtenida originalmente de Richard G. Wyatt del National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA.
- Rotavirus cepa YM. Esta cepa procedente del lab. del Dr. Luis Padilla, fue obtenida originalmente del Dr. Carlos Arias del Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, México.

Reactivos

- Albúmina de suero bovino. #C A-3059, Sigma, St. Louis, Missouri. E.U.A.
- Anticuerpos policlonales y monoclonales anti-NSP3 obtenidos de ratón. Estos fueron producidos en el laboratorio usando la proteína NSP3 del rotavirus YM fusionada a Glutathion S-transferasa expresada en *E. coli* como antígeno para inmunizar a ratones. Las bacterias en las que se expresó la proteína habían sido transformadas con el plásmido pGEX-YM7 donado por la Dra. Susana López del Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, México. Los anticuerpos monoclonales se seleccionaron por inmunotinción de células MA104 infectadas con el rotavirus YM (datos sin publicar).
- Anticuerpos policlonales de conejo anti-NSP3 del rotavirus SA11. Estos anticuerpos fueron producidos en el laboratorio inmunizando conejos y usando como antígeno a NSP3 del rotavirus SA11 fusionada a una cola de histidinas en su extremo carboxilo. Esta proteína recombinante fue expresada en *E. coli* y purificada por cromatografía de afinidad.
- Anticuerpo monoclonal 1E11 específico contra VP6 de rotavirus. El anticuerpo monoclonal 1E11 anti-VP6 fue producido por el Dr. Luis Padilla en el laboratorio del Dr. Harry Greenberg (Universidad de Stanford, Stanford, California, E.U.A.) a partir de un ratón inmunizado con el rotavirus de humano ST3 y seleccionado por un ensayo inmunoenzimático contra el rotavirus Wa.

- Anticuerpo monoclonal 255/60 específico contra VP6 de rotavirus. Este anticuerpo fue producido en el laboratorio del Dr. Harry Greenberg de la Universidad de Stanford, Stanford, California, E.U.A., a partir de un ratón inmunizado con rotavirus de simio RRV y seleccionado por un ensayo inmunoenzimático contra el rotavirus RRV (Greenberg *et al.*, 1993, White *et al.*, 1984).
- Anticuerpos IgG anti-His (H-15):sc803 de conejo. Con una concentración de 200 µg/ ml. #C c1103, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, E.U.A.
- ADN polimerasa Taq Platinum™. #C 11304-011, Invitrogen, Carlsbad California, E.U.A.
- Cocktail de inhibidores de proteasas Complete™. #C 1697498, Boehringer Mannheim, Alemania.
- Isopropanol grado de pureza HPLC. #C AH323-4 Burdick & Jackson, Muskegon, Michigan, E.U.A.
- Marcador de peso molecular de proteínas para condiciones no desnaturizantes. #C MW-DN-500, Sigma, St Louis. Missouri, E.U.A.
- Marcador de peso molecular proteico Rainbow marcado con ¹⁴C. #C CFA 755. Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Inglaterra.
- Marcador de peso molecular de ADN 1 Kb. #C 10787-018, Invitrogen, Carlsbad, California, E.U.A.
- Marcador de peso molecular de 100 pbs. #C 15611-015, Invitrogen, Carlsbad, California, E.U.A.
- Medio mínimo esencial de Eagle. #C 61100-061, Invitrogen, Carlsbad, California, E.U.A.
- Metionina ³⁵S Redivue™. #C AG1594 Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Inglaterra.
- Oligonucleótidos YMT75, YMX3, YMT55 y YMX35 manufacturados por Invitrogen, E.U.A.
- Plásmido pET28c. #C 69866-3, Novagen, San Diego, California, E.U.A.

Este plásmido permite obtener proteínas con una cola de histidinas en el extremo carboxilo de la misma. El plásmido esta bajo el control de la polimerasa T7 y confiere resistencia a kanamicina.

- Plásmido pET28-RRV5. Esta construcción formada por el plásmido pET28c y la secuencia de NSP1 del rotavirus de la cepa RRV fue producida por Wilbert O. Zarco en el laboratorio del Dr. Luis Padilla del Instituto de investigaciones Biomédicas, UNAM, México.
- Plásmido pGEX, NA Genbank M2167, Amersham Biosciences. Este vector de expresión permite obtener proteínas fusionadas a glutation S-transferasa en el extremo amino. Este vector esta regulado por el operador de lactosa.
- Plásmido pGEX-YM7. Esta construcción formada por el plásmido pGEX y la secuencia de NSP3 permite expresar a NSP3 de rotavirus YM. La construcción fue donado por la Dra. Susana López del Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, México.
- Proteína A- Sefarosa CL-4B. #C 17-0780-01 Sigma, Uppsala, Suecia.
- Sistema ThermoScript para RT-PCR. #C 11146-024, Carlsbad, California, E.U.A.
- Sistema de purificación de RNA por minicolumna RNAeasy. #C 74103 Qiagen, Alemania.
- Sistema de purificación de DNA por minicolumna Wizard. #C A7170, Promega, Madison, Wisconsin, E.U.A.
- Sistema de transcripción/traducción TNT T7 Quick Master. #C L1170, Promega. Madison, Wisconsin, E.U.A.
- Sistema de transcripción/traducción TNT T7 para DNA obtenido por PCR. #C L 5540. Promega. Madison, Wisconsin, E.U.A.
- Suero fetal bovino, #C 16000-044. Life Technologies, E.U.A.
- Trifluorometano (Freon 11). #C L0288A, Cydsa, México.

Anexo B. Secuencia de los genes 5 y 7 de rotavirus YM

La secuencia del gene 5 de rotavirus que codifica a la proteína no estructural NSP1 fue reportada por Kojima K. *et al.* 1996

```
1 ggcttttttt tatgaaaagt cttgtggaag ccatggctac cttcaaagat gcttgttatc
61 actataagag gttgaataaa ttgaatcatg cagtcttgaa actaggagtt aatgatgcat
121 ggaggccatc acctccaaca aaatacaaaag gatggtgttt agactgttgt caacatactg
181 atttgactta ctgtagaggc tgttctatat atcatgtttg tcagtggtgt aatcaatag
241 gtagatgttt tcttgatgac gaaccgcatt tattgagaat gaggactttt aaaaatgaca
301 taacaaagga ggacttagca aatttgatcg acatgtacaa tgtgttggtc cctgtaaatc
361 agaaaatagt gaataaatc attaataaca caaaacagca taagtgtaga aatgaacttg
421 tgccgcaatg gtataatcat ttattgatgc caataacact acaatcttta tcaatagaat
481 tgagtggtag catttattat atttttggtt attatgatga catgaaaaac gttaatcaga
541 ctccattttc atttgtaaat ttgatagata tatatgatag attgttgctt gacgatgtga
601 atttcaacag aatgtcattt ttaccattag tattacagca agaatatgca attcgggtatt
661 ttcaaaaatc aaggtttatc agtgaagaaa agaggcagat taatcattct cattttccca
721 ttaatatact ggaaaattta cataatccaa attttaaaa acaaattact cgcaattgca
781 gtactatggt tggtaaatgg aatgaagcat gtacacttgt caaagatatt ggaacttact
841 tcgaaatttt aaaaacatcg catgttgaat ttatgatgt ttcaccaga tgcagaatgt
901 ttacacagca taaactaaaa gcagtatcaa aagtgatcaa accaaattac gccacttcaa
961 atcatagagc tctagcaact gaagtataca attgtagatg gtgttcggta aatactagtt
1021 ttattgtatg gaatgacttt agacttagaa atatttgta taatgtatta aatttcatta
1081 gagcttttag caagtcaaat acccgcattg gacattgttc atcacaagag caaatacata
1141 gctatattag agatgttttt gatgtgtgtg acgaaaataa gtggaacaca tctgtatcag
1201 gtatatttaa ttgcttagaa tcagtagagt tggatggcgt tcactatggt ctgcttaatc
1261 atgaagtgaa ctgggatggt gctaacgtat taattcaaaa tattgggaaa attccacaaa
1321 tactgactct gaatgatggt ataacagcct tgcattctat gatttacgat tggtttgata
1381 tcaggatatat gagaaacaca ccaacgacta cgtttacagt tgacaaatta agacaaactgt
1441 gtgcaagacg gaagattgct gattacgact cgggtctatc tgatgttgag taattgaaga
1501 aagatcacat ttgccaccac aagactccct gcactagagt agcgcctagc cagcataaaa
1561 tgtgacc
```

La secuencia del gen 7 de Rotavirus YM que codifica para la proteína NSP3 fue proporcionada por la Dra. Susana López del Instituto de Biotecnología, UNAM.

```
1  ccttttaatg  cttttcagtg  gttgatgctc  aagatggagt  ctactcagca
51  gatggtaggt  tcaattatca  acacctcttt  tgaagctgca  gttgttgctg
101 ccacttcaac  attagaattg  atgggtattc  aatatgatta  caatgaggta
151 tatactagag  tcaaaagtaa  gtttgattat  gtgatggatg  actctgggtg
201 taaaaacaac  cttttaggtg  aagctatgac  tattgatcaa  gcgttaaata
251 gaaaatttgg  ctcagttgta  agaaatagaa  attggatgac  tgattctaaa
301 atagtggcta  aattagatga  ggatgtaaac  aaacttagaa  tgatggtatc
351 ttctaaagga  attgatcaaa  agatgagagt  acttaatgct  tgctttagtg
401 tgaaaagaat  accaggaaaa  tcatcatcaa  tcattaagtg  taccaggctt
451 atgagagaca  aatagaacg  aggagagggt  gaagttgacg  actcatttgt
501 tgatgagaag  atggaaattg  aactattga  ttggaaatct  agatatgacc
551 aattagagaa  gagatttgag  tactaaagc  agagagttag  tgaaaagtat
601 aataattggg  tgcagaaaagc  gaagaaagtg  aatgaaaata  tgtactccct
651 tcaaaatggt  atttcacagc  aacaaaacca  gatagcagat  cttcaacagt
701 attgtaacaa  attgaaaact  gacttacaga  gcaaaattag  ttcactagtg
751 tcatcagtag  aatggtatgt  aagatctatg  gaactgtcag  acgatgtaa
801 aactgatatt  gaacaacaac  taaattcaat  tgatgcaatc  aatcctatca
851 atgctataga  cgatcttgaa  tcattgatta  gaaatttgat  ccaagattac
901 gacagaacat  ttttaatggt  gaaaggactt  gtgaggcaat  gcaactatga
951 atgtacgtat  gaatagtcac  ataataaaa  ctatattaac  catctacaca
1001 tgaccctcta  tgagcacaat  agttaaagc  taacactgtc  aaaaacctaa
1051 atggctatag  gggcgttatg  tgacc
```

Anexo C. Composición de los reactivos usados para el estudio de la interacción

La preparación de los reactivos esta reportada en Current Protocols on Molecular Biology (Ausubel *et al.*, 1996)

Azul de bromofenol 1 %

0.01 mg/mL azul de bromofenol en glicerol al 50%

Buffer de Lisis no desnaturizante

1ml Titron X-100, Tris-HCL 50 mM (pH 7.4), NaCl 300 mM, EDTA 5 mM y 0.02% azida de sodio

Buffer disruptor 5x

Tris-HCl 0.05 M (pH 6.8), EDTA 0.05 M, NaCl 0.05 y SDS al 5 %

Buffer de entrecruzamiento

50 mM de NaH_2PO_4 , 100 mM NaCl, 0.1 % β -mercaptoetanol, 10 % glicerol pH 7.3

Buffer Laemli 1x

3.03 gr de tris base, 14.4 de glicina, 1 gr de SDS y 1000 mL de agua. pH 8.3

Buffer de lavado de baja astringencia

1 % Nonidep P40, 1 % desoxicolato de sodio, y Tris-HCl 0.05 M

Buffer de lavado de media astringencia

1% triton, 0.1 % SDS, 1% desoxicolato de sodio, 150 mM de NaCl, 25 mM tris pH 7.4, 5 mM EDTA

Buffer de lavado de alta astringencia

1% triton, 0.31 % SDS, 150 mM de NaCl, 25 mM tris pH 7.4, 5 mM EDTA

Buffer de muestra 1x

0.625 mL de tris HCl 0.5 M pH 6.8, 1 mL de SDS 10%, 0.5 % glicerol, 0.25 mL de β -mercaptoetanol, 0.23 mL de azul de bromofenol 1 % y 2.3 mL de agua destilada

Buffer de síntesis DNA 5x

250 mM trisi-HCl pH 8.4, 375 mM acetato de potasio, 40 mM acetato de magnesio

Buffer TAE 50x

224 g tris base, 57.1 mL ácido acético glacial, 37.2 g $\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 900 mL agua destilada

Coctel de inhibidores Complete 25 X

1 tableta disolver en 2 mL de agua destilada

Gel concentrador de poliacrilamida SDS-PAGE (para un gel de 16 x 4 cm)

Contiene un volumen final de 10mL suficientes: 4.6 mL de agua destilada, 3.5 mL de acrilamida-bisacrilamida (30%-0.8%), 1.8 mL tris 0.5 M (pH 6.8), 50 μL persulfato de amonio 10%, 50 μL SDS 10% y 5 μL TEMED

Gel separador de poliacrilamida SDS-PAGE (para un gel de 16 x 13 cm)

Contiene un volumen total de 20 mL suficientes: 9.3 mL de agua destilada, 6.5 mL de acrilamida-bis acrilamida (30%-0.8%), 7.5 mL tris 1.5 M (pH 8.8), 0.15 mL SDS, 150 μL persulfato de amonio 10 % y 10 μL de TEMED

Gel concentrador de poliacrilamida en condiciones nativas

Los componentes y concentraciones son iguales a las descritas para el gel concentrador de poliacrilamida SDS-PAGE sin SDS. Para el análisis del estado oligomérico, solo se modificó la cantidad de poliacrilamida en el gel separador.

Gel separador de poliacrilamida en condiciones nativas

Se usaron geles con diferentes concentraciones de poliacrilamida por lo que su composición se describe en de la tabla 3.

Tabla 3. Composición de los geles de poliacrilamida al 12%, 10% y 8%.

Solución	12 %	10 %	8 %
Agua destilada	9.3 mL	10.3 mL	10.3 mL
tris 1.5 M (pH 8.8)	7.5 mL	7.5 mL	7.5 mL
acrilamida-bis acrilamida (30%.0.8%)	12 mL	10 mL	8 mL
persulfato de amonio 10%	150 µL	150 µL	150 µL
TEMED	10 µL	10 µL	10 µL

Marcador de peso molecular de ADN lineal de 1Kb

100 µL solución stock marcador, 100 µL agua destilada, 100 µL azul de bromofenol 1%

Medio Esencial Mínimo (MEM) con SFB 10 %

400 mL de medio esencial mínimo, 12 mL de bicarbonato de sodio 7.5 %, 4 mL de penicilina/estreptomicina 100x, 4 mL de glutamina 100x y 42 mL de SFB

PBS 1x

10 mL PBS A 10x, 10 mL PBS B 10x, 10 mL PBS C 10x, 70 mL agua destilada

Proteína A-Sefarosa

1.5 g de proteína A-Sefarosa en 30 mL de tris 50 mM pH7.5

Verseno

0.2 g EDTA×Na, 100 mL PBS A 10x, 900 mL agua destilada

Anexo D. Producción de la proteína NSP1-His

Para la amplificación del gene que codifica NSP1 de rotavirus RRV se usaron los oligonucleótidos RRV5-30 y RRVPT-53 los cuales se diseñaron basándose en la secuencia reportada por Dunn *et al.*, 1994. El oligonucleótido RRV5-30 contiene además de la secuencia complementaria del gen, un sitio de corte reconocido por la endonucleasa Nco. Esto mismo sucede con el oligonucleótido RRVPT-53 que contiene la secuencia complementaria del gen 5 y un sitio de corte reconocido por la endonucleasa Xho. Usando estos sitios de corte, se insertó la secuencia del gen 5 del rotavirus RRV en el plásmido pET28c. Este plásmido cuyo mapa se encuentra descrito en la figura A1 contiene el promotor de la polimerasa T7 lo que permite expresar la proteína en un sistema libre de células y además codifica para una cola de seis histidinas la cual se une en el extremo carboxilo de la proteína expresada. La cola de histidinas permite tanto la purificación de la proteína como su inmunoprecipitación usando un anticuerpo anti-histidinas. Adicionalmente, la expresión de la proteína usando la construcción pET28-RRV5 puede ser regulada mediante un operador de lactosa cuando se expresa en bacterias. Esta construcción fue producida por Wilbert O. Zarco en el laboratorio del Dr. Luis Padilla del Instituto de investigaciones Biomédicas, UNAM, México (Zarco O. Wilbert, tesis de licenciatura, BUAP, 2004).

