

00551

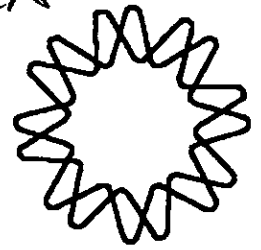
4  
2EJ

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA



COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES  
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS  
PROFESIONAL Y DE POSGRADO



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PARTÍCULAS  
PSEUDOVIRALES DEL ROTAVIRUS YM EXPRESADAS  
MEDIANTE EL SISTEMA DE BACULOVIRUS**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
**MAESTRO EN CIENCIAS**  
P R E S E N T A  
**ING. FERNANDO HERNANDEZ TERAN**

(BIOQUÍMICA)

269397

Cuernavaca, Morelos

1998



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

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES  
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS  
PROFESIONAL Y DE POSGRADO

PROGRAMA ACADÉMICO DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

El presente trabajo se desarrolló en el Departamento de Genética y Fisiología Molecular, bajo la dirección de la Dra. Susana López Charretón. Durante el desarrollo de este trabajo, el autor fué becario del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y del Howard Hughes Medical Institute.

*A Lucy*

*A mis hijas:      Melisa Fernanda  
                                 Alejandra  
                                 Andrea*

*A mi Madre Emma, por todo.*

*A mis hermanos: Rosa Mayela, Alberto, Martha Patricia, Javier, Jesús,  
Rodolfo y Emma.*

## **Agradecimientos**

A Susana por ser mi tutora, maestra y por todo el apoyo que me ha brindado.

A Carlos, por todo su apoyo.

A los miembros del jurado y de mi comité tutorial por sus valiosas aportaciones:

Dra. Susana López Ch.  
Dra. Hilda Lomelí B.  
Dr. Lorenzo P. Segovia  
Dr. Celso Ramos G.  
Dra. Beatriz Gómez G.  
Dr. Ernesto Méndez S.  
Dr. Octavio Tonatiuh R.

A Ma. Elena, Rafa, Gina, Martha, C. Arturo, Selene, Jimena, Pedro, Ramón, Fernando, M.A. Dector, Pedro Jr., Ernesto, Luis, Pavel, Nedi, Dixie, Diana, Mariela, Vicky, Rosalva, Pedro G., Mercedes y Rocío.

A la familia Romero Guido

A L.Gabriel O., Ricardo Oropeza y Martha Sosa.

A Lorena López de la Unidad de Microscopía Electrónica, Pedro Saucedo de la Unidad de Dibujo y a José Avilés del Instituto de Investigaciones Biomédicas/UNAM.

# INDICE

|  |    |
|--|----|
| <b>RESUMEN</b>   | 1  |
| <b>INTRODUCCIÓN</b>  | 2  |
| GENERALIDADES DE ROTAVIRUS   | 2  |
| ESTRUCTURA   | 3  |
| CICLO REPLICATIVO  | 5  |
| <b>ANTECEDENTES</b>  | 10 |
| EL SISTEMA DE EXPRESIÓN DE BACULOVIRUS                                     | 10 |
| <b>OBJETIVOS</b>   | 16 |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>  | 17 |
| ESTRATEGIA GENERAL DE CLONACIÓN  | 17 |
| CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR <i>pVL1392/YM2</i>                                 | 17 |
| CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR <i>pVL1392/YM6</i>                                 | 17 |
| CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR <i>pVL1392/YM5'Δ9</i>                              | 19 |
| CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR DE EXPRESIÓN MÚLTIPLE<br><i>pAcAB4/YM2/YM6/YM9</i> | 19 |
| OBTENCIÓN DE LOS BACULOVIRUS RECOMBINANTES                                 | 22 |
| SELECCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS BACULOVIRUS<br>RECOMBINANTES               | 24 |
| PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE VLPs  | 27 |
| CARACTERIZACIÓN DE VLPs  | 28 |
| MICROSCOPIA ELECTRÓNICA  | 28 |
| INMUNOBLOT   | 29 |
| ELISA (ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)                                  | 29 |
| ENSAYOS DE HEMAGLUTINACIÓN   | 30 |
| ENSAYOS DE UNIÓN A CÉLULAS MA104   | 31 |

|  |    |
|--|----|
| ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE LA UNIÓN DE VLPs A CÉLULAS<br>MA104   | 31 |
| ENSAYOS DE PERMEABILIZACIÓN DE CÉLULAS MA104   | 32 |
| <b>RESULTADOS</b>  | 33 |
| CONSTRUCCIÓN DE LOS VECTORES DE TRANSFERENCIA PARA<br>BACULOVIRUS <i>pVL1392/YM2</i> , <i>pVL1392/YM6</i> ,<br><i>pVL1392/YM5'Δ9</i> y <i>pAcAB4/YM2/YM6/YM9</i> | 33 |
| GENERACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS BACULOVIRUS<br>RECOMBINANTES   | 33 |
| CARACTERIZACIÓN DE VLPs  | 38 |
| INTEGRIDAD FÍSICA DE LAS PARTÍCULAS  | 38 |
| COMPOSICIÓN PROTEICA DE LAS VLPs   | 38 |
| PROPIEDADES ANTIGÉNICAS DE LAS VLPs  | 40 |
| HEMAGLUTINACIÓN  | 41 |
| UNIÓN DE LAS VLPs A CÉLULAS MA104  | 43 |
| COENTRADA DE α-SARCINA A LA CÉLULA INDUCIDA POR<br>LAS VLPs  | 44 |
| <b>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES</b>  | 46 |
| <b>APÉNDICE</b>  | 50 |
| <b>REFERENCIAS</b>   | 54 |



## RESUMEN

Los rotavirus del grupo A son considerados como el principal agente etiológico de gastroenteritis deshidratante en la población infantil, produciendo un alto índice de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. Se calcula que cada año los rotavirus son responsables de aproximadamente un millón de muertes en todo el mundo. Los viriones maduros son partículas icosaédricas de aproximadamente 75 nm de diámetro, están formados de tres capas concéntricas de proteínas (VP2, VP4, VP6 y VP7) y un genoma constituido por 11 segmentos de RNA de doble cadena; la proteína más interna (VP2) envuelve al genoma y a las proteínas VP1 y VP3. El genoma codifica para seis proteínas estructurales y seis proteínas no estructurales.

La coexpresión de las proteínas VP2, VP4, VP6 y VP7 de rotavirus, en células de insecto, dirigidas por baculovirus recombinantes resulta en la formación de partículas pseudovirales o VLPs (Virus-Like Particles) que son morfológicamente similares a los rotavirus nativos y conservan propiedades estructurales y funcionales del virus nativo.

El presente trabajo consistió en establecer el sistema de ensamble de las VLPs en nuestro laboratorio, mediante la coexpresión de las proteínas VP2, VP4, VP6 y VP7 del rotavirus porcino YM, en células de *Spodoptera frugiperda* (Sf9), utilizando el sistema de expresión de baculovirus, el cual es utilizado ampliamente para sobreexpresar diversos genes.

Los baculovirus recombinantes que expresan las proteínas de la cápside del rotavirus YM, se obtuvieron por recombinación homóloga utilizando vectores de transferencia recombinantes. Los baculovirus se purificaron y se amplificaron para la coinfección de cultivos de células Sf9. La coinfección de las células de insecto con cada uno de los baculovirus recombinantes, resultó en el ensamble de las proteínas recombinantes en VLPs. Las pseudopartículas se analizaron bajo criterios bioquímicos e inmunológicos, y conservaron algunas propiedades estructurales y funcionales de los rotavirus nativos.

## INTRODUCCION

### Generalidades de rotavirus

Las enfermedades diarreicas afectan a millones de personas alrededor del mundo, teniendo un mayor impacto en la población infantil. Estudios epidemiológicos demuestran que los rotavirus del grupo A son la causa principal de la gastroenteritis deshidratante severa en niños menores de 5 años, produciendo un alto índice de morbilidad y mortalidad (Glass *et al.*, 1996; Kapikian & Chanock, 1996); se calcula que los rotavirus son responsables de aproximadamente un millón de muertes anuales en el mundo (Walsh & Warren, 1979). Se ha observado que estos agentes infecciosos también están ampliamente distribuidos entre muchas especies animales de importancia económica para el hombre, provocando considerables pérdidas económicas.

Es importante considerar que la mortalidad causada por estos virus es mucho mayor en países subdesarrollados que en los países desarrollados, sin embargo, la frecuencia de infección es comparable en ambos países (Glass *et al.*, 1991).

Los rotavirus fueron descubiertos en 1973 en células de la mucosa intestinal de biopsias de niños en la fase sintomática de gastroenteritis no bacteriana (Bishop *et al.*, 1973). Posteriormente, se propuso el nombre de rotavirus (del latín *rota* = rueda) por su morfología característica observada en el microscopio electrónico [Fig. 1] (Flewett *et al.*, 1974). Mediante esta técnica se han observado tres tipos de partículas: partículas virales maduras o de triple capa, partículas de doble capa que carecen de las proteínas de la capa externa y nucleocápsides de 76.5, 70.5 y 50 nm de diámetro, respectivamente (Estes & Cohen, 1989).

Los rotavirus (familia *Reoviridae*) son diferentes morfológica y serológicamente a los reovirus y orbivirus, motivo por el cual se les consideró como un género diferente dentro de la familia *Reoviridae* (Estes *et al.*, 1983; Kapikian & Chanock, 1996).

Existe gran interés a nivel mundial en disminuir la mortalidad causada por los rotavirus, y varios grupos de investigación están encaminados a desarrollar estrategias de inmunización efectivas para controlar la infección, ya que aun medidas de higiene no han sido suficientes para controlarla.

En los últimos años se han logrado importantes avances en el estudio de los rotavirus y se cuenta con métodos eficientes para su diagnóstico, sin embargo, aún no existen métodos efectivos para su prevención. Se ha estimado que una vacuna efectiva podría evitar un gran número de las muertes causada por estos virus.

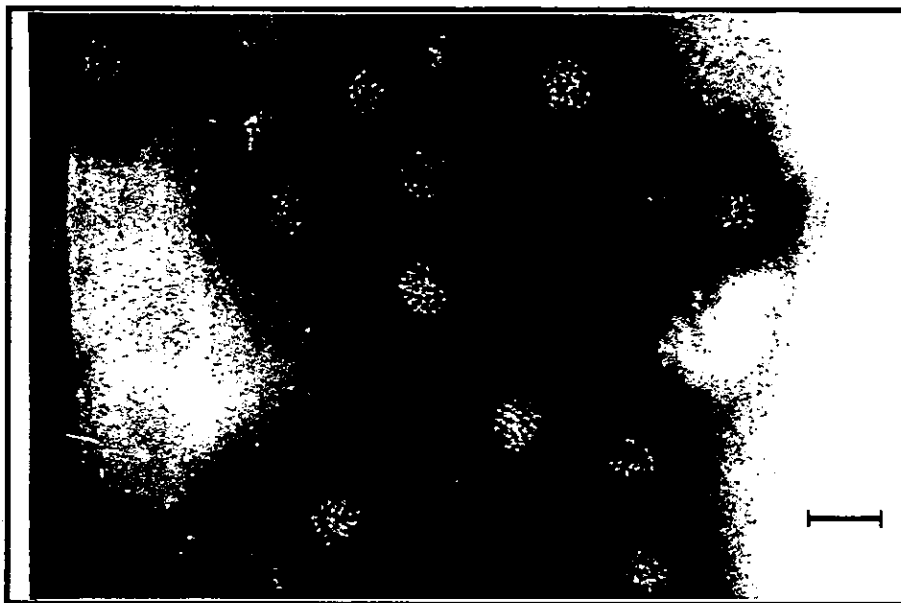


Figura 1. Micrografía electrónica de partículas de rotavirus. La barra equivale a 100 nm de longitud.

### Estructura

Por medio de técnicas de criomicroscopía electrónica y procesamiento de imágenes, se han obtenido detalles de la morfología y organización estructural de los rotavirus [Fig. 2]. Al igual que otros miembros de la familia *Reoviridae*, los rotavirus son partículas icosaédricas de aproximadamente 75 nm (750 Å) de diámetro que no poseen envoltura lipídica. Estos virus están constituidos de tres capas concéntricas de proteínas y un genoma de once segmentos de RNA de doble cadena (dcRNA) (Shaw *et al.*, 1993) [Fig. 2]. La capa interna, que constituye el "core" o nucleocápside viral, está formada por 120 moléculas de la proteína VP2 (102 kDa) que envuelve a los

once segmentos de RNA y a las proteínas VP1 y VP3. La proteína VP2 presenta una alta afinidad por el RNA y participa en la organización del genoma de una manera simétrica (Prasad *et al.*, 1996) y recientemente se demostró que desempeña un papel estructural importante en la replicación *in vitro* del RNA viral (Zeng *et al.*, 1996; Patton *et al.*, 1997). Las proteínas VP1 y VP3 son las proteínas menos representadas entre las proteínas estructurales del virión. La VP1 es la RNA polimerasa viral dependiente de RNA. Las proteínas VP1 y VP2 participan en la síntesis la cadena negativa de los RNAs mensajeros virales (mRNAs) en ensayos de replicación *in vitro* (Zeng *et al.*, 1996). Por otro lado, la proteína VP3 es la guanililtransferasa viral que cataliza la adición del “cap” en el extremo 5’ de los mRNAs. La capa intermedia del virión está formada por 260 trímeros de la proteína VP6 (45 kDa), que constituye un poco más del 50% de la masa total de la partícula. Esta proteína ha sido asociada a la actividad de transcriptasa viral, aunque se considera que su papel es principalmente estructural (Sandino *et al.*, 1986).

La capa más externa del virus está formada por 780 moléculas de la glicoproteína VP7 (37 kDa) y por 60 dímeros de la proteína VP4 (88 kDa) que se proyectan desde la superficie del virus (120 Å) interactuando con las proteínas VP6 y VP7. Las proteínas VP4 y VP7 son necesarias para la infectividad viral (Bridger & Woode, 1976; Estes *et al.*, 1979); la proteína VP4 es altamente inmunogénica, es la hemaglutinina viral y está involucrada directamente en la unión y en la penetración del virus a la célula huésped (Greenberg *et al.*, 1983; Kalica *et al.*, 1983; Estes & Cohen, 1989; Ruggeri & Greenberg, 1991). La proteína VP7 forma la superficie lisa del virus, su función aún no es clara, sin embargo, hay evidencias que sugieren que esta proteína puede influir sobre la proteína VP4, modificando algunas de sus características funcionales (Méndez *et al.*, 1996).

La partícula viral posee 132 canales acuosos que se extienden desde la nucleocápside hasta la superficie de la capa externa. Se propone que a través de estos canales se realiza un intercambio de metabolitos para la transcripción del genoma viral (Estes & Cohen, 1989). A través de criomicroscopía electrónica, se ha observado que los mRNAs virales emergen de partículas transcripcionalmente activas a través de estos canales (Lawton *et al.*, 1997).

Las proteínas no estructurales (NSPs), no forman parte del virión, sin embargo su expresión en las células infectadas y la capacidad de la mayoría de ellas para unirse a ácidos nucleicos, sugiere que su presencia es importante para la morfogénesis y la replicación del genoma viral (Patton, 1995).

Los once segmentos de dcRNA que conforman el genoma viral, cuando son separados por electroforesis en geles de poliacrilamida, producen un patrón característico de acuerdo a su longitud [Fig. 2]. La longitud de estos segmentos varía desde 667 pares de bases (pb) (segmento 11) hasta 3302 pb (segmento 1), constituyendo un genoma de aproximadamente 18500 pb (Estes & Cohen, 1989; Patton, 1995). Cada segmento codifica para al menos una proteína viral, de las cuales seis son proteínas estructurales (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 y VP7) y cinco son proteínas no estructurales (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 y NSP6). Cada uno de estos genes comparten características comunes: regiones no traducidas en los extremos 5' y 3' (5' y 3' NTR), "cap" (m<sup>7</sup>Gppp<sup>(m)</sup>GPy) en el extremo 5' del RNA mensajero y ausencia de poliadenilación en el extremo 3' (Imai *et al.*, 1983; McCrae & McCorquodale, 1983). Las regiones 5' y 3' NTR están altamente conservadas en los once segmentos del genoma viral y entre los genes homólogos de diferentes cepas de rotavirus, presentando la secuencias consenso: 5'GGCTTTTAAA-----TGTGACC3' (Estes & Cohen, 1989).

### **Ciclo replicativo**

Los rotavirus presentan tropismo por los enterocitos diferenciados del intestino delgado. Estudios de microscopía electrónica indican que el proceso de replicación en cultivos de células permisibles a la infección, como las células epiteliales de riñón de simio MA104, es muy similar al de las células intestinales.

Las etapas tempranas de la infección por rotavirus han sido examinadas mediante técnicas bioquímicas y por microscopía electrónica. Aunque el receptor celular de los rotavirus aún no ha sido identificado, la unión de los virus a la célula se lleva a cabo a través de la proteína VP4 (Ruggeri & Greenberg, 1991; Méndez *et al.*, 1993, 1996). Las cepas de rotavirus de origen animal dependen para unirse de la presencia de ácido siálico en la superficie de la membrana celular (Fukudome *et al.*,

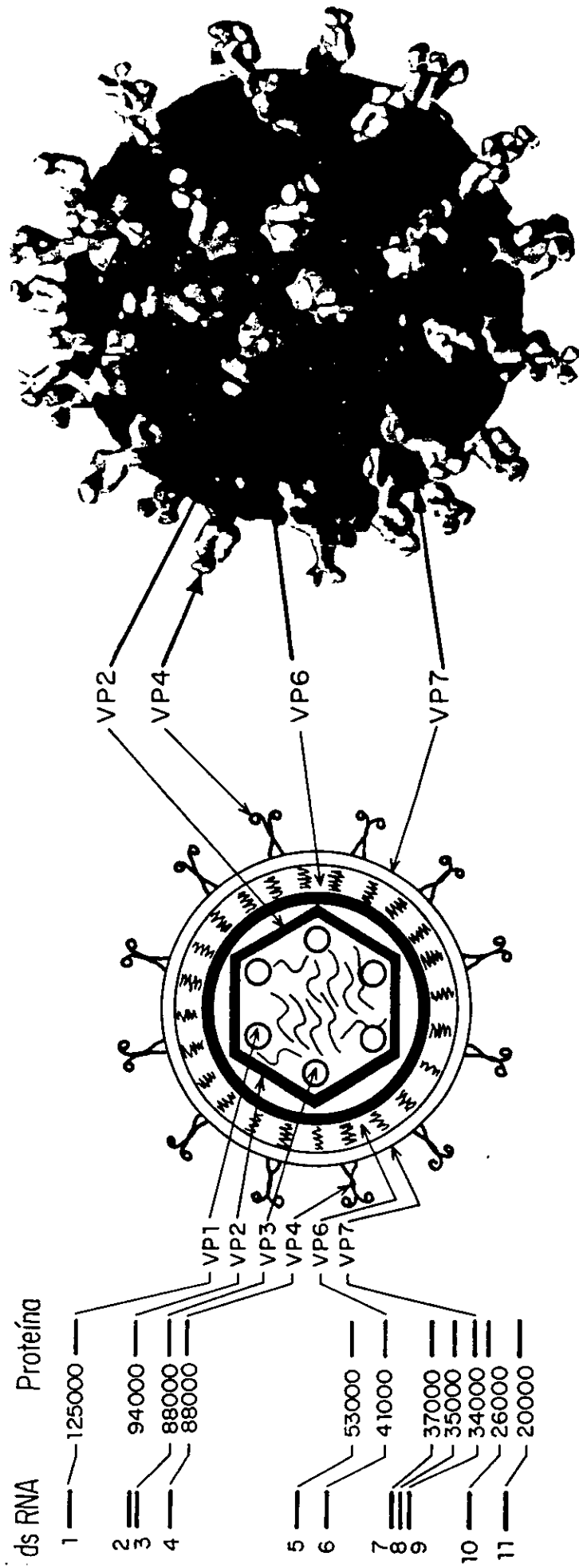


Figura 2. Representación esquemática de una partícula de rotavirus y su composición genómica. En la gráfica se representa el patrón característico de los segmentos de RNA genómico, cuando se separan en geles de poliacrilamida y las proteínas que son codificadas por cada uno de estos segmentos (izq.). En el centro de la figura se representa el corte transversal de una partícula viral y la localización de cada una de las proteínas del virión. A la derecha, se muestra una partícula de rotavirus con su estructura tridimensional obtenida por criomicroscopía electrónica y procesamiento de imágenes (Yeager *et al.*, 1994).

1989; Méndez *et al.*, 1993). Esta propiedad le brinda a los rotavirus la capacidad de hemaglutinar eritrocitos *in vitro*. La unión del virus a la célula se inhibe cuando las células son tratadas con sialidasas (ej. neuraminidasa) que remueven el ácido siálico de la membrana, o bien cuando el virus se preincuba con glicoforina A (gph A), que es una glicoproteína rica en residuos de ácido siálico (Yolken *et al.*, 1987; Méndez *et al.*, 1993). Sin embargo, esta interacción con siálicos no es esencial para una infección productiva (Méndez *et al.*, 1993). Por otro lado, las cepas de rotavirus de origen humano no requieren de ácido siálico y su infectividad no es inhibida por el tratamiento de las células con neuraminidasa ni por la presencia de glicoforina A (Fukudome *et al.*, 1989; Yolken *et al.*, 1987).

La penetración (pero no la unión) del virus a la célula requiere de un corte proteolítico de la proteína VP4 por tripsina, generando los polipéptidos VP8 (28 kDa) y VP5 (60 kDa) (López *et al.*, 1985; Arias *et al.*, 1996). Se ha demostrado que VP8 es la subunidad responsable de la adsorción del virus a la célula (Fiore *et al.*, 1991) y que las cepas de rotavirus aisladas de animales se unen al ácido siálico de la membrana a través de esta proteína (Bastardo & Holmes, 1980; Fukudome *et al.*, 1989; Ruggeri & Greenberg, 1991; Lizano *et al.*, 1991; Ludert *et al.*, 1996). Recientemente Fuentes-Panán y colaboradores, mapearon la región de la proteína VP8 que interacciona con los residuos de ácido siálico de la membrana celular (Fuentes-Panán *et al.*, 1995); adicionalmente Isa y colaboradores demostraron que los aminoácidos Tyr-155, Tyr-188 y Ser-190 que están localizados en este mismo polipéptido, son esenciales para la unión con el ácido siálico (Isa *et al.*, 1997).

Después de la internalización del virus, la transcriptasa viral endógena se activa para producir los mRNAs virales [Fig. 3], los cuales son utilizados como templados para la síntesis de proteínas virales y del dcRNA genómico (Patton, 1995). Por ensayos de replicación *in vitro*, se encontró que en las regiones 5' NTR (10 primeros nucleótidos) y 3' NTR (últimos 7 nucleótidos) existen señales esenciales para la replicación (Wentz *et al.*, 1996). La replicación y la encapsidación son eventos concomitantes, ya que los dcRNAs virales no se encuentran libres en el citoplasma. Cada partícula viral de la progenie contiene al menos una copia de cada uno de los once segmentos de dcRNA.

El ensamble de las partículas virales se lleva a cabo en una región densa del citoplasma llamada viroplasma, constituida principalmente de proteínas virales. Estas partículas inmaduras

migran hacia el retículo endoplásmico gemando hacia su interior, durante este proceso las partículas adquieren una membrana lipídica transitoria que por un mecanismo desconocido es intercambiada por las proteínas de la capa externa, VP4 y VP7, concluyendo así su maduración [Fig. 3]. Los virus son liberados al exterior por lisis celular e inician un nuevo ciclo de replicación (Estes & Cohen, 1989).

Recientemente Cuadras y colaboradores demostraron que los rotavirus inducen una permeabilización temprana de la membrana celular promoviendo la coentrada de toxinas (i. e.  $\alpha$ -sarcina) que en condiciones normales no son permeables a la célula (Cuadras *et al.*, 1997); la coentrada de la toxina  $\alpha$ -sarcina resultó ser específica de la infección y dependiente de la dosis viral.

No se conoce con detalle el papel de la mayoría de las proteínas no estructurales (NSPs) en el ciclo de replicación del virus, sin embargo, el hecho de que estas proteínas se unan a RNA (Boyle & Holmes, 1986; Hua *et al.*, 1994; Kattoura *et al.*, 1992; Mattion *et al.*, 1992; Poncet *et al.*, 1993; Patton, 1995), se encuentren en partículas subvirales con actividad de replicasa (Patton, 1986) e interactúen entre sí en ensayos *in vivo* (González *et al.*, 1998), sugiere que forman parte del complejo de replicación; además de que podrían participar en el ensamblaje y empaquetamiento del genoma viral.



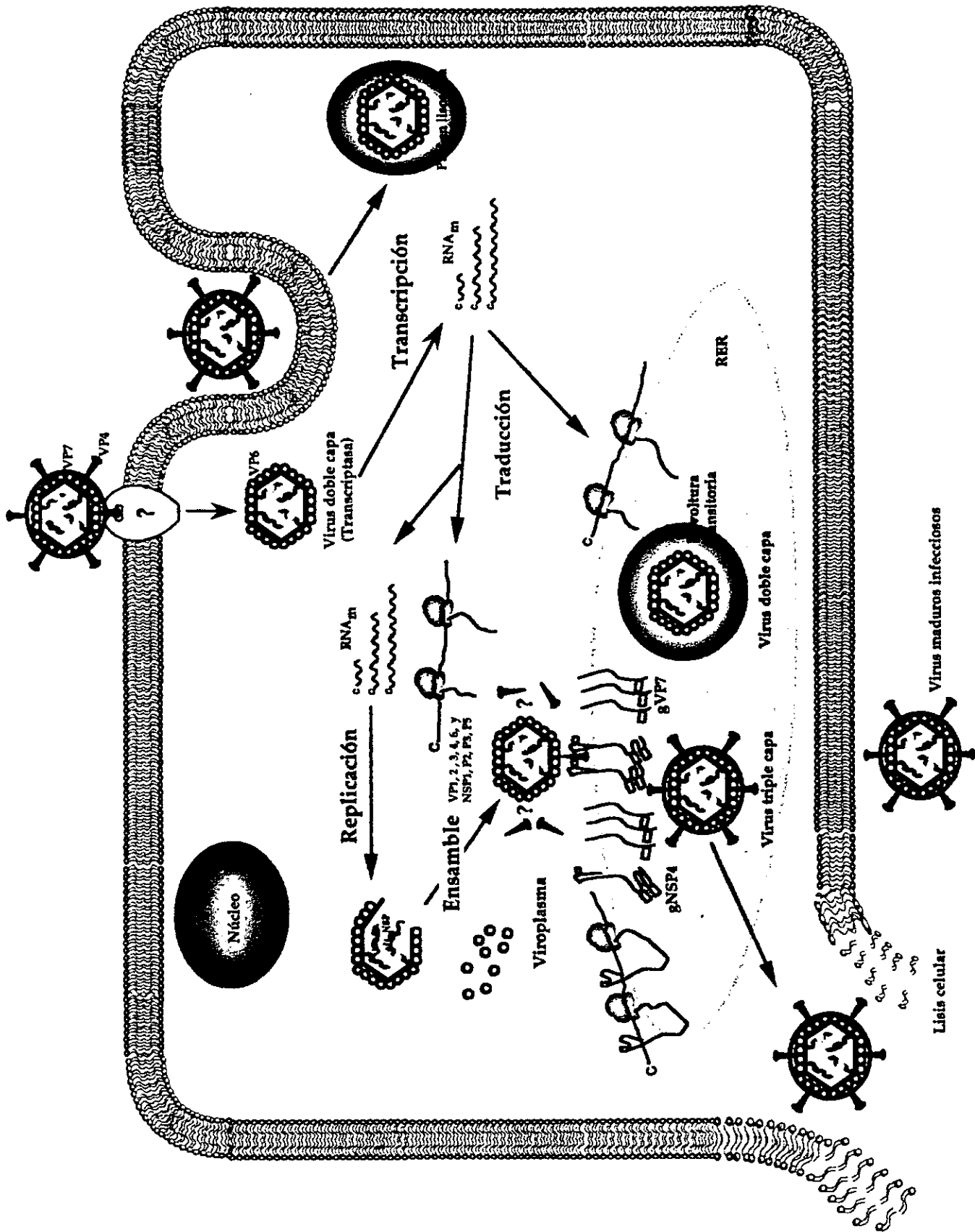


Figura 3. Principales características del ciclo de replicación de rotavirus

## ANTECEDENTES

### El sistema de expresión de baculovirus

El sistema de expresión de baculovirus es uno de los sistemas eucariotes más versátiles que se utiliza para expresar genes heterólogos de diferentes orígenes (hongos, plantas, bacterias, virus y mamíferos) en células de insecto (Summer & Smith, 1987). Una de las principales ventajas que ofrece este sistema es que en la mayoría de los casos, las proteínas expresadas son estructuralmente similares a como se expresan en su entorno natural, y tanto la actividad biológica como las propiedades inmunológicas se conservan debido a que los procesos post-traduccionales (corte del péptido señal, glicosilación, acilación, fosforilación, amidación, etc.) que tienen las proteínas, en las células de insecto, son similares a los que ocurren en el sistema homólogo (eucariote).

Este sistema de expresión consiste en clonar los genes heterólogos en regiones no esenciales del genoma de baculovirus. Los baculovirus recombinantes son utilizados para infectar células de insecto permisibles para el virus, en donde se expresa la proteína heteróloga, clonada bajo un promotor.

En general, la clonación de los genes heterólogos en baculovirus, se realiza en vectores de transferencia bajo la regulación de promotores fuertes de genes no esenciales (polihedrina o p10) del virus de la polihedrosis nuclear (AcNPV) que se expresan en etapas tardías de la infección. El vector recombinante que contiene el gene heterólogo, se co-transfecta con el DNA de baculovirus en células de insecto (*Spodoptera frugiperda* [Sf9]). El DNA del baculovirus que se utiliza, está linearizado y modificado genéticamente, al cual se le ha eliminado el gene de la polihedrina y genes esenciales para su replicación. Estos genes esenciales, así como el gene heterólogo, son transferidos al DNA de baculovirus por el vector de transferencia mediante un evento de doble recombinación homóloga al co-transfectar ambos DNAs en las células de insecto [Fig. 4]. Teóricamente todos los baculovirus, que resultan de esta co-transfección, son virus recombinantes que expresan el gene heterólogo.

# SISTEMA DE EXPRESION DE BACULOVIRUS

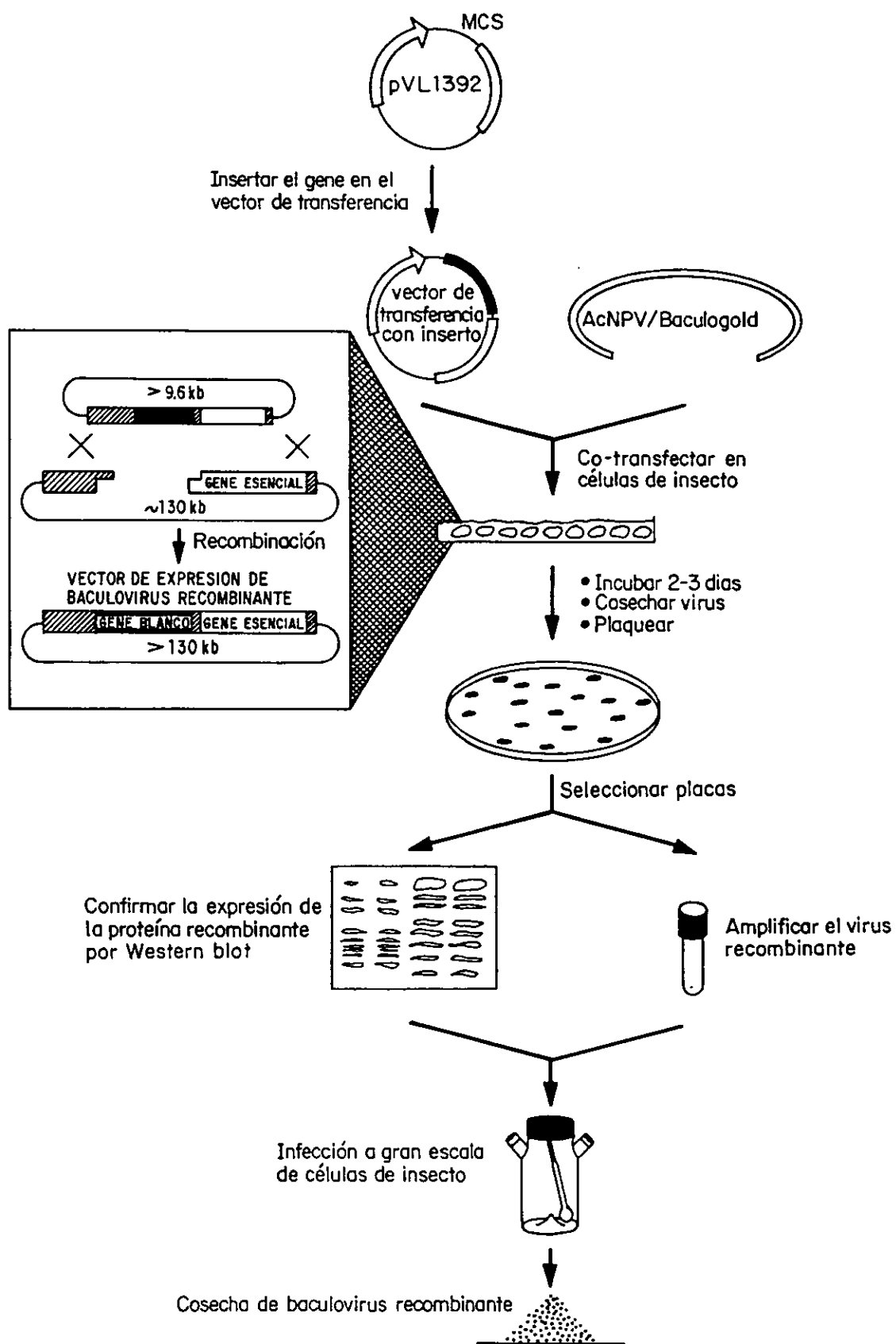


Fig 4. Sistema de expresión de baculovirus

La infección de las células Sf9 con el baculovirus recombinante, inhibe la expresión de los genes de la célula huésped, permitiendo un alto nivel de producción de RNA mensajero viral y síntesis de la proteína heteróloga; los niveles de producción de la proteína recombinante oscilan entre 1% y 50% del total de la proteína de la célula.

En general, la expresión genética en sistemas heterólogos tiene como objetivo principal producir grandes cantidades de proteína recombinante para uso terapéutico, diagnóstico y/o para estudiar sus funciones biológicas. En el sistema de expresión de baculovirus se han expresado una gran variedad de genes [tabla 1], entre los cuales se incluyen genes de proteínas regulatorias del sistema inmune, proteínas de unión a DNA, oncoproteínas, proteínas estructurales virales entre muchas otras.

**Tabla 1**  
Algunas proteínas expresadas en el sistema de baculovirus

| <b>Proteína</b>  | <b>Referencia</b>   |
|--|---|
| Interferón alfa  | Horiuchi <i>et al.</i> , 1987; Maeda <i>et al.</i> , 1984; 1985 |
| Interferón beta  | Smith <i>et al.</i> , 1983                                      |
| IL-2   | Smith <i>et al.</i> , 1985                                      |
| IL-3   | Miyajima <i>et al.</i> , 1987                                   |
| Kruppel de <i>Drosophila</i>   | Ollo & Maniatis, 1987.  |
| Activador qa-1f de <i>Neurospora</i>                                     | Baum <i>et al.</i> , 1987                                       |
| Transactivador p40 <sup>s</sup> de HTLV-1                                | Jeang <i>et al.</i> , 1987                                      |
| Hemaglutinina del virus de la influenza                                  | Kuroda <i>et al.</i> , 1986; Possee, 1986                       |
| Antígeno T de SV40   | Rice <i>et al.</i> , 1987                                       |
| VP2 del virus "bluetongue"   | Inumaru & Roy, 1987   |
| <i>Gag</i> y <i>Env</i> del VIH  | Madisen <i>et al.</i> , 1987; Hu <i>et al.</i> , 1987           |
| HA del virus de la parainfluenza   | Coelingh <i>et al.</i> , 1987                                   |
| Antígeno de superficie del virus de la hepatitis B                       | Kang <i>et al.</i> , 1988                                       |
| Polimerasa del virus de la influenza                                     | St. Angelo <i>et al.</i> , 1987                                 |
| $\beta$ -galactosidasa   | Pennock <i>et al.</i> , 1984                                    |
| CAT  | Carbonell <i>et al.</i> , 1985                                  |
| Proteína de fusión (F) del virus sincitial respiratorio de bovino (BRSV) | Pastey & Samal, 1998  |

La eficiencia de producción y la flexibilidad para expresar proteínas heterólogas en este sistema, ha contribuido significativamente a elucidar características estructurales y funcionales de un gran número de ellas en diversos sistemas virales (Miller, 1988). Así, los estudios sobre los componentes y los requerimientos necesarios para el ensamble de las proteínas de la cápside del virus "bluetongue" (BTV) están siendo estudiados ampliamente utilizando este sistema de expresión. Se ha sintetizado, purificado y cristalizado una de las proteínas de la capa externa (VP7) del virus "bluetongue" (Oldfield *et al.*, 1990), también se han sintetizado y caracterizado partículas no infecciosas de poliovirus (Urakawa *et al.*, 1989). Por otro lado, varios antígenos del virus de la hepatitis B también han sido expresados (Takehara *et al.*, 1988).

En rotavirus, este sistema está siendo ampliamente utilizado para expresar y estudiar la estructura y función de las proteínas estructurales y no estructurales. Además, se ha observado que la coexpresión de las proteínas estructurales VP2, VP4, VP6 y VP7 de rotavirus en células de insecto, mediadas por baculovirus recombinantes, resulta en la formación de partículas pseudovirales (VLPs [Virus-Like Particles]) [Fig. 5]. Mediante microscopía electrónica se ha observado que estas pseudopartículas son morfológicamente similares a las partículas de rotavirus nativos y mantienen algunas de las propiedades bioquímicas y funcionales de los rotavirus, ya que conservan epítopes neutralizantes y no neutralizantes, producen inmunidad en ratones y conejos y se unen específicamente a células en cultivo (Crawford *et al.*, 1994; Conner *et al.*, 1997; Ciarlet *et al.*, 1997).

A pesar de los avances que se han obtenido en los últimos años acerca del estudio de la biología molecular de los rotavirus, existe una serie de incógnitas sobre su ciclo de replicación, especialmente en las etapas tempranas de la infección. Los estudios sobre la(s) actividad(es) de las proteínas de la capa externa del virus, durante los procesos de adsorción y penetración a la célula han sido limitados debido a que todavía no existe un sistema que permita alterar un gene específico de rotavirus y recuperarlo dentro de una partícula infecciosa (genética reversa). Como un método alternativo, las VLPs representan potencialmente un buen modelo, ya que los genes de las proteínas estructurales se pueden manipular genéticamente y estudiar su fenotipo en estas partículas

pseudovirales. Las VLPs también pueden ser una valiosa herramienta para determinar los requerimientos estructurales necesarios para el ensamble de cada una de las proteínas virales.

El objetivo de este trabajo es implementar el sistema de ensamble de VLPs expresadas en el sistema de baculovirus, como una alternativa para el estudio de los eventos tempranos de la infección, tales como la unión y la penetración del virus a la célula. Es importante mencionar que al inicio de este trabajo, en nuestro laboratorio ya se contaba con el baculovirus recombinante que expresa la proteína VP4 del rotavirus YM (Fuentes-Pananá *et al.*, 1995).

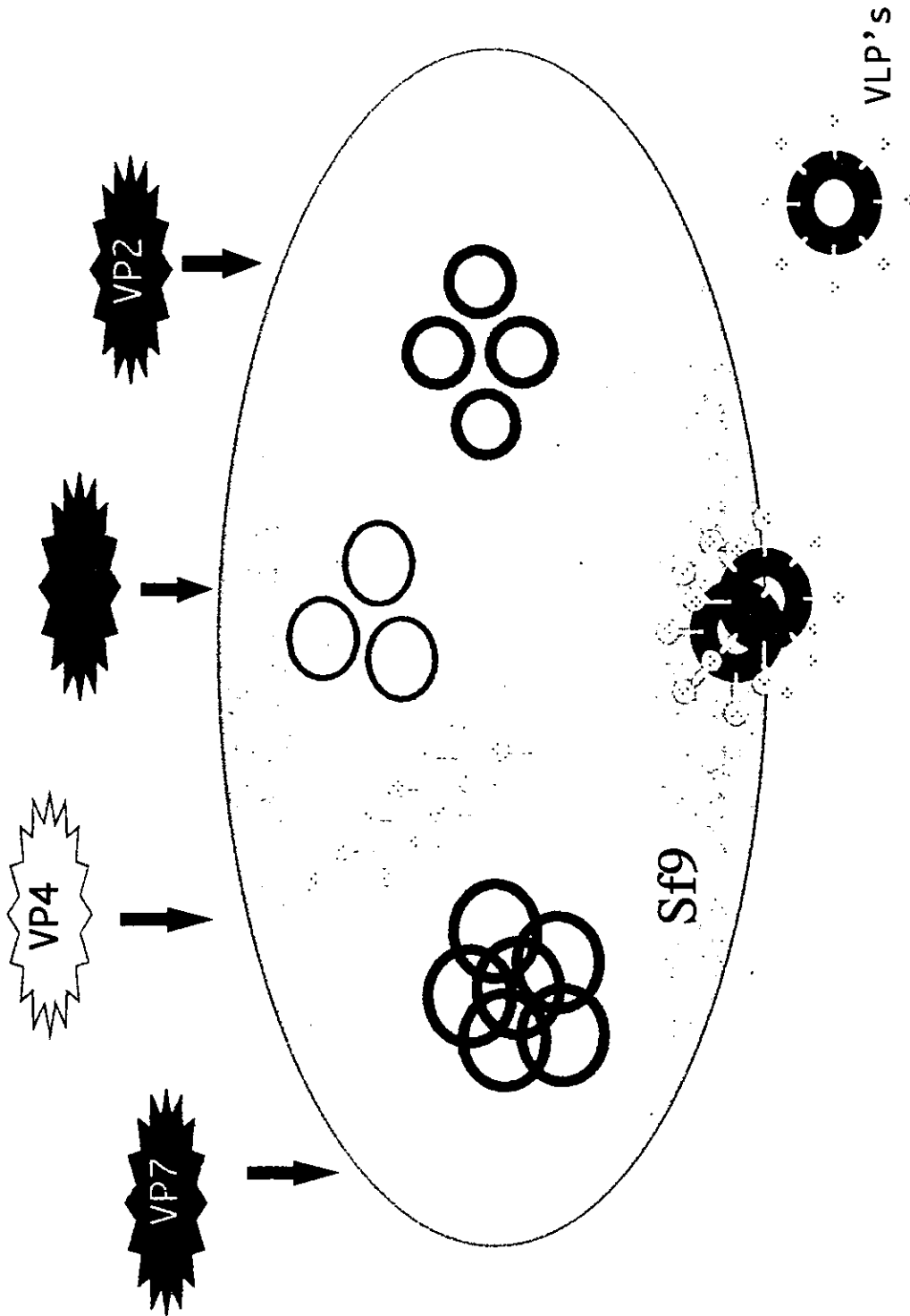


Figura 5. Representación esquemática del ensamble de VLP's en células Sf9 utilizando el sistema de expresión de baculovirus

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Establecer el sistema de ensamble de VLPs mediante la coexpresión de las proteínas de la cápside del rotavirus YM en el sistema de baculovirus.

### Objetivos específicos

I) Clonar\* los genes 2, 6 y 9 del rotavirus YM, que codifican para las proteínas estructurales VP2, VP6 y VP7, respectivamente, en el vector de transferencia (pVL1392) para baculovirus.

II) Seleccionar, purificar y expresar los baculovirus recombinantes.

III) Producir y purificar las VLPs.

IV) Caracterizar las VLPs mediante procedimientos bioquímicos e inmunológicos.

\* La clonación del gene 4 (VP4) del rotavirus YM en baculovirus, se hizo previamente a este trabajo (Fuentes-Panana *et al.*, 1995).



## MATERIALES Y METODOS

### Estrategia general de clonación

Cada uno de los genes del rotavirus YM utilizados en este proyecto, se clonaron previamente en nuestro laboratorio en el plásmido pGEM-3Z en el sitio *Sma* I. Adicionalmente, fueron transcritos y traducidos *in vitro* corroborando la expresión de cada uno de ellos. A partir de estas clonas iniciamos el trabajo de subclonación de los genes 2, 6 y 9 en los vectores de transferencia para baculovirus. Las técnicas experimentales utilizadas en este proyecto, están basadas esencialmente en las descritas en los manuales "*Current Protocols in Molecular Biology*" (Ausubel *et al.*, 1992), "*Molecular Cloning*" (Sambrook *et al.*, 1989) y "*Baculovirus Expression Vector System Manual*" (Crossen & Gruenwald, 1996).

Para la generación de los vectores recombinantes, se diseñó una estrategia de clonación que permitió insertar, de manera individual, los genes 2, 6 y 9 del rotavirus YM en el vector de transferencia para baculovirus pVL1392 (Invitrogen), bajo el promotor del gene de la polihedrina. En este vector el gene de la polihedrina ha sido sustituido por un sitio de clonación múltiple en el que se inserta el gene heterólogo. Una vez obtenidos los vectores recombinantes, se amplificaron en *Escherichia coli* JM101.

### Construcción del vector *pVL1392/YM2*

El gene 2 del rotavirus YM, que codifica para la proteína VP2, se obtuvo de la clona 2-28 por digestión con las enzimas de restricción *EcoR* I y *BamH* I. El fragmento correspondiente al gene 2 (2.7 kb) se insertó en la zona de clonación múltiple del plásmido pVL1392 en los sitios *EcoR* I y *BamH* I, quedando bajo la regulación del promotor del gene de la polihedrina ( $p^{ph}$ ) [Fig. 6].

### Construcción del vector *pVL1392/YM6*

El gene 6 del rotavirus YM, que codifica para la proteína VP6, se obtuvo de la clona 6-5 por digestión con las enzimas *EcoR* I y *BamH* I. El fragmento correspondiente al gene 6 (1.3 kb) se ligó

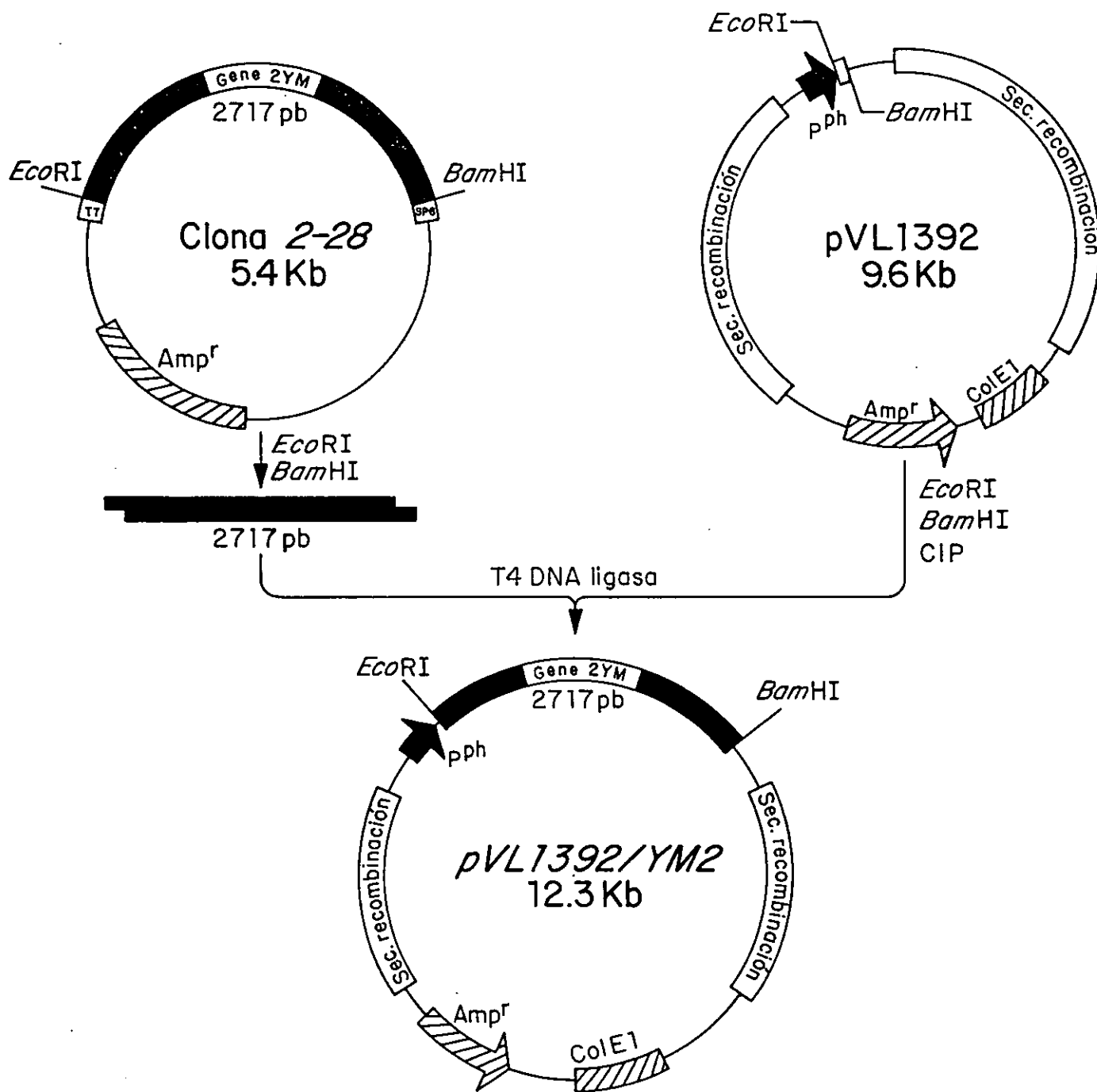


Figura 6. Construcción del vector de transferencia para baculovirus *pVL1392/YM2*

en la zona de clonación múltiple del plásmido pVL1392 en los sitios *EcoR* I y *BamH* I bajo la regulación del p<sup>h</sup> [Fig. 7].

### **Construcción del vector *pVL1392/YM5'Δ9***

El gene 9 del rotavirus YM, que codifica para la proteína VP7, se modificó en el extremo 5' mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR [Polymerase Chain Reaction]) para eliminar una de las dos regiones hidrofóbicas que forman parte del extremo amino de la proteína.

La modificación del extremo 5' consistió en amplificar el gene 9 de YM por PCR, a partir de la clona 9-4 utilizando los oligonucleótidos sintéticos 5' *CAG AAT TCT AAG ATC TGA TAT C 3'* (oligonucleótido 1) y 5' *ATT TAG GTG ACA CTA TAG 3'* (oligonucleótido 2). El oligonucleótido 1 corresponde a los nucleótidos 68-89 de la hebra codificante del gene 9, y el oligonucleótido 2 hibrida en una región inmediata del extremo 3'. El producto de DNA obtenido con estos oligonucleótidos, representa el gene 9 de YM con 67 pb menos en el extremo 5'; adicionalmente, el producto contiene un sitio *Bgl* II generado por el oligonucleótido 1 como parte de la estrategia de clonación. Este producto de PCR se digirió con la enzima *EcoR* I para obtener un pequeño fragmento de 178 pb correspondiente al extremo 5' del gene 9 que se ligó en el sitio *EcoR* I de la clona original (9-4), previamente digerida con la misma enzima y defosforilada en sus extremos. La sustitución de este fragmento modificado de 178 pb en la clona original, fué con la finalidad de disminuir la posibilidad de introducir errores en el gene generados por la *Taq* DNA polimerasa durante la reacción de PCR. La clona generada (5'Δ9-4) contiene 71 pb menos en el extremo 5' del gene 9. Para generar el vector de transferencia para baculovirus que exprese la proteína VP7, el gene 9 (980 pb) modificado se obtuvo de la clona 5'Δ9-4 con las enzimas *Bgl* II y *BamH* I y fué insertado en el sitio *Bgl* II del plásmido pVL1392, esta clona fué denominada *pVL1392/YM5'Δ9* [Fig. 8].

### **Construcción del vector de expresión múltiple *pAcAB4/YM2/YM6/YM9***

Con la finalidad de coexpresar simultáneamente las proteínas VP2, VP6 y VP7, dirigidas por

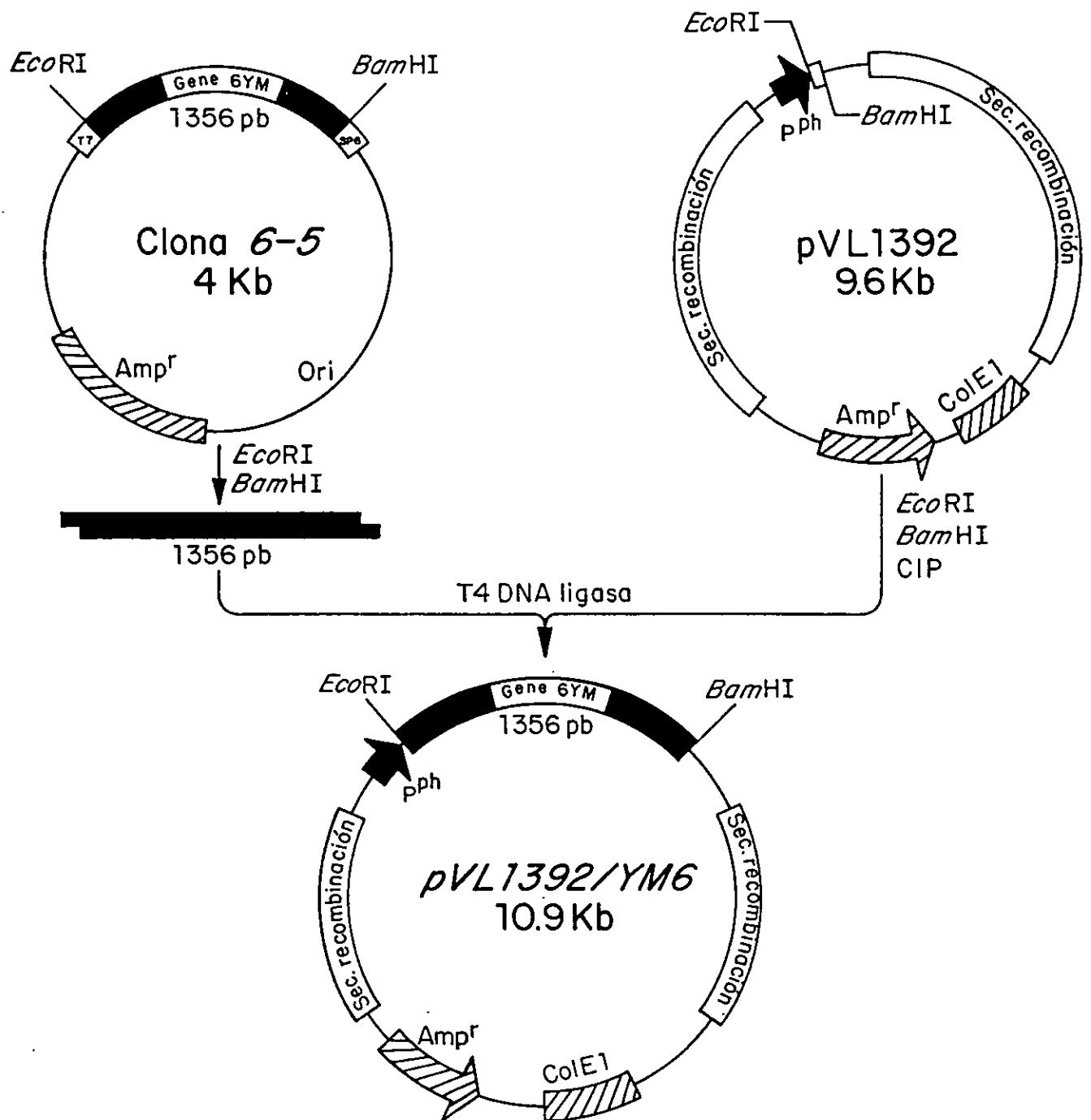


Figura 7. Construcción del vector de transferencia para baculovirus *pVL1392/YM6*

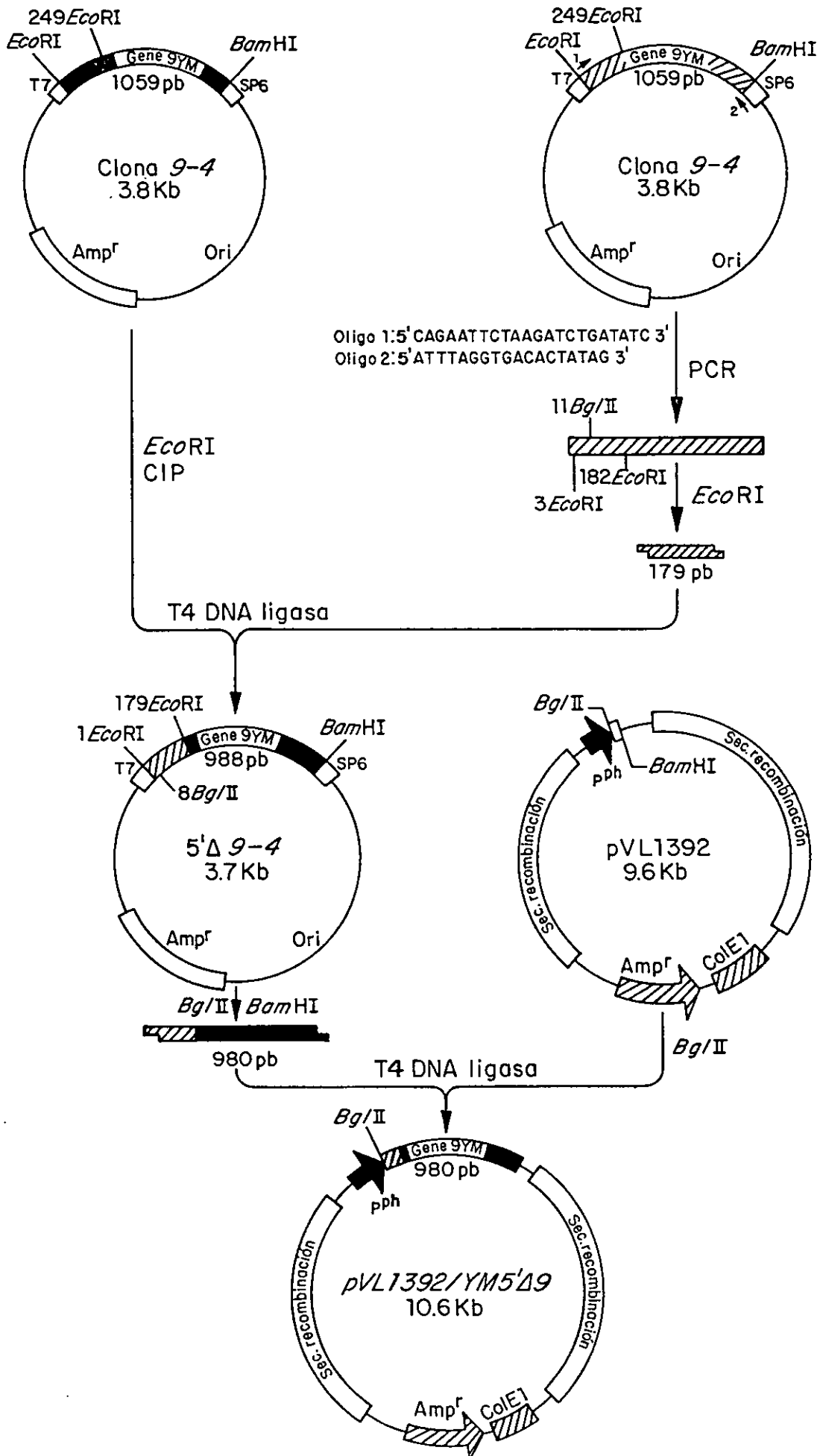


Figura 8. Construcción del vector de transferencia para baculovirus pVL1392/YM5'Δ9

un mismo vector recombinante, se construyó el vector de expresión múltiple *pAcAB4/YM2/YM6/YM9*. La idea de construir un vector múltiple que expresara estas tres proteínas (vector triple), fué con la finalidad de utilizar solo dos virus recombinantes (un baculovirus triple que exprese VP2/VP6/VP7+un baculovirus que exprese VP4) para la producción de VLPs y disminuir las variables del sistema. Adicionalmente la clonación independiente del gene 4 de YM facilita la generación de mutantes de la proteína VP4, por mutagénesis dirigida, para ser ensambladas en VLPs y estudiar su fenotipo en trabajos futuros.

La construcción del vector de expresión múltiple se realizó como sigue: el gene 2 de YM se obtuvo del vector *pVL1392/YM2* por digestión con la enzima *Sma* I y se ligó en el plásmido *pAcAB4* en el sitio *Sma* I bajo el promotor  $p^{10}$  [Fig. 9]. La clona generada *pAcAB4/YM2*, se digirió con la enzima *Bgl* II en cuyo sitio se insertó el gene 6 de YM bajo la regulación del promotor  $p^{10}$  [Fig. 9], obtenido previamente por digestión de la clona *pVL1392/YM6* con las enzimas *Bgl* II y *Bam*H I. La nueva clona se denominó *pAcAB4/YM2/YM6*. Finalmente, el gene 9 de YM, se obtuvo de la clona *5'Δ9-4* con las enzimas *Bgl* II y *Bam*HI y se insertó en el sitio *Bam*HI de la clona *pAcAB4/YM2/YM6* bajo el promotor  $p^{ph}$  [Fig. 9]. El vector de expresión múltiple generado se denominó *pAcAB4/YM2/YM6/YM9*.

La construcción de cada uno de los vectores de transferencia, se verificó mediante digestión con enzimas de restricción.

Es importante recordar que el vector de transferencia, así como el baculovirus recombinante que expresa el gene 4 del rotavirus YM, fué construido por Ezequiel Fuentes en nuestro laboratorio durante su trabajo de tesis de Maestría previo al presente proyecto (Fuentes-Pananá *et al.*, 1995).

### **Obtención de los baculovirus recombinantes**

Para la generación de los baculovirus recombinantes que expresan cada una de las proteínas de rotavirus mencionadas, se cotransfectaron individualmente los vectores de transferencia recombinantes y el DNA de baculovirus (Baculo-gold; Pharmingen), mediante lipofección con un lípido catiónico (Celfectina; GIBCO BRL) en células Sf9. La mezcla de transfección se preparó en

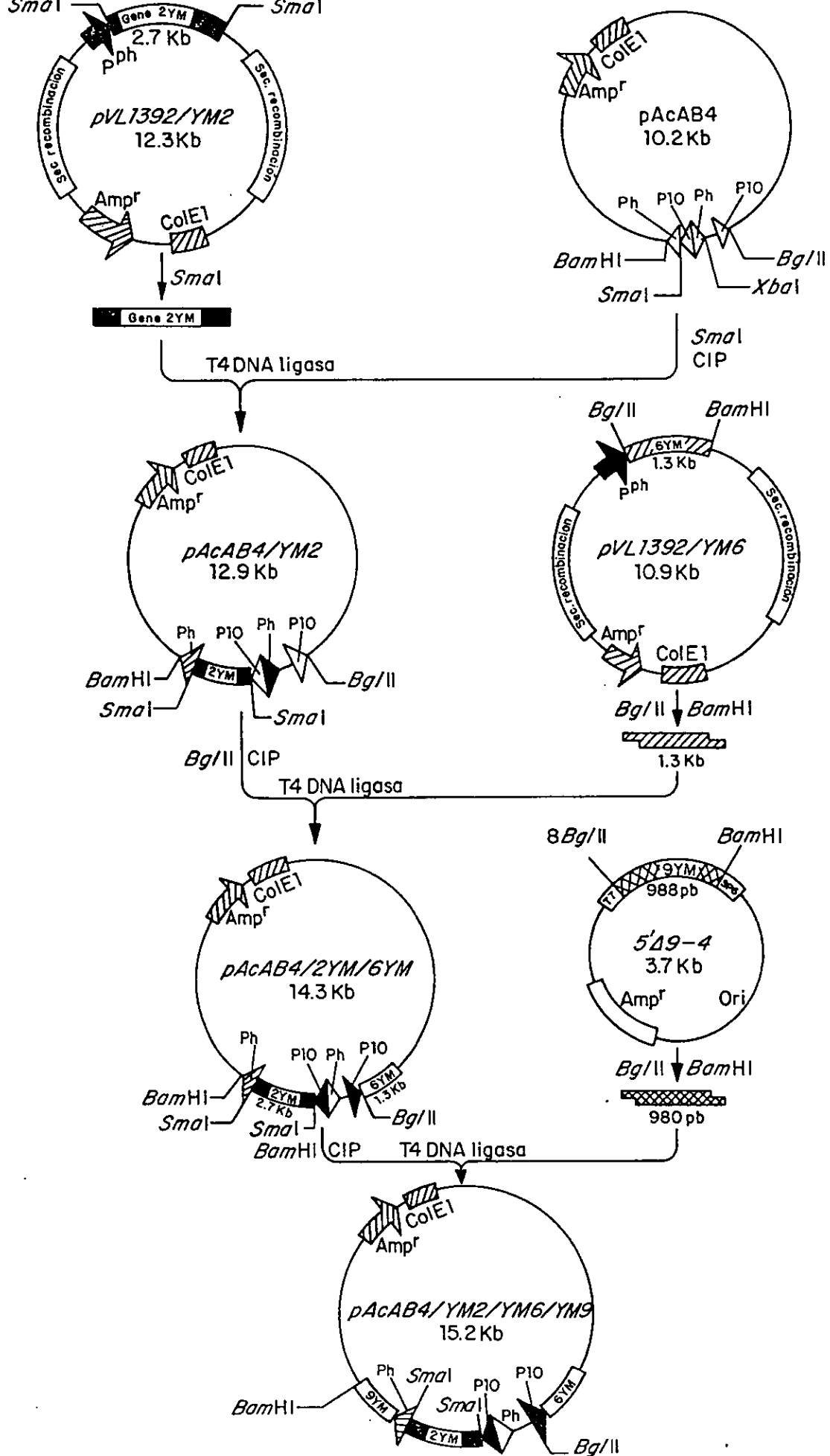


Figura 9. Construcción del vector de transferencia para baculovirus *pAcAB4/YM2/YM6/YM9*.

tubos de poliestireno de 12x75 mm (Elkya Products, Inc.) consistiendo de 250 ng del vector recombinante y 50 ng de baculogold, resuspendidos en 20  $\mu$ l de agua destilada. La mezcla se incubó durante 15 min a temperatura ambiente y se añadieron 6  $\mu$ l de celfectina y 100  $\mu$ l de medio Grace's (GIBCO) sin suero bovino fetal (FBS), la mezcla se homogenizó cuidadosamente y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron a la mezcla 550  $\mu$ l de medio Grace's sin FBS y se transfirió a una monocapa de células Sf9 previamente lavadas 1 vez con medio Grace's sin FBS. La monocapa de células se incubó durante 2 h a 27°C con movimiento lento para homogenizar la mezcla de transfección sobre las células. Después se retiró la mezcla y se añadieron a las células 2 ml de medio Hink's conteniendo 10% de FBS, las células se incubaron durante 96 h a 27°C y se cosechó el lisado celular que contiene la progenie viral recombinante. El sobrenadante del lisado se clarificó por centrifugación durante 1 min a 1000 rpm en una centrífuga eppendorf y se almacenó a 4 °C.

### **Selección y purificación de los baculovirus recombinantes**

Los baculovirus recombinantes se aislaron mediante un ensayo en placa elaborado con diluciones seriadas 1:10 ( $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ) de los sobrenadantes del lisado obtenido de la cotransfección. Las diluciones se prepararon en un volumen total de 700  $\mu$ l con medio Hink's conteniendo 10% de FBS, los 700  $\mu$ l se añadieron a monocapas (independientes) de células Sf9 ( $1.5 \times 10^6$  células), previamente adheridas durante 30 min a 27°C en una caja de 6 pozos (Costar). Las células se incubaron durante 2 h a 27°C en movimiento lento. Posteriormente el inóculo se retiró y las células se cubrieron con 3 ml de una mezcla de medio Hink's y agarosa a una concentración final de 1.5% (para 20 ml: 10 ml de agarosa de bajo punto de fusión al 3%, 8 ml de Hink's 2x, 2 ml de FBS) equilibrada a 37°C, la mezcla se añadió lentamente por las paredes del pozo. Posteriormente, las células se incubaron durante 120 h a 27°C en ambiente húmedo. Para observar las placas formadas por los baculovirus recombinantes, las células se tiñeron añadiendo a cada pozo 2 ml de una mezcla de rojo neutro con agarosa (para 15 ml: 7.5 ml de agarosa normal, 1 ml de rojo neutro al 1%, 6.5 ml de Hink's 2x) equilibrada a 37°C, una vez que la agarosa se solidificó (~ 20 min) las células se



protegeron de la luz cubriendo la caja con papel aluminio y se incubaron durante 12 h a 27°C. Las células se observaron en un transiluminador de luz blanca [Fig. 10]. En la figura 10 las placas aparecen como pequeños puntos traslucidos, que corresponden a pequeños grupos de células que teóricamente han sido infectadas por una partícula viral. Las placas se aislaron de la monocapa por punción con una pipeta Pasteur, se colocaron en 1 ml de Hink's conteniendo 10% de FBS en tubos eppendorf de 1.5 ml, se homogenizaron por agitación y se almacenaron a 4°C hasta su uso.

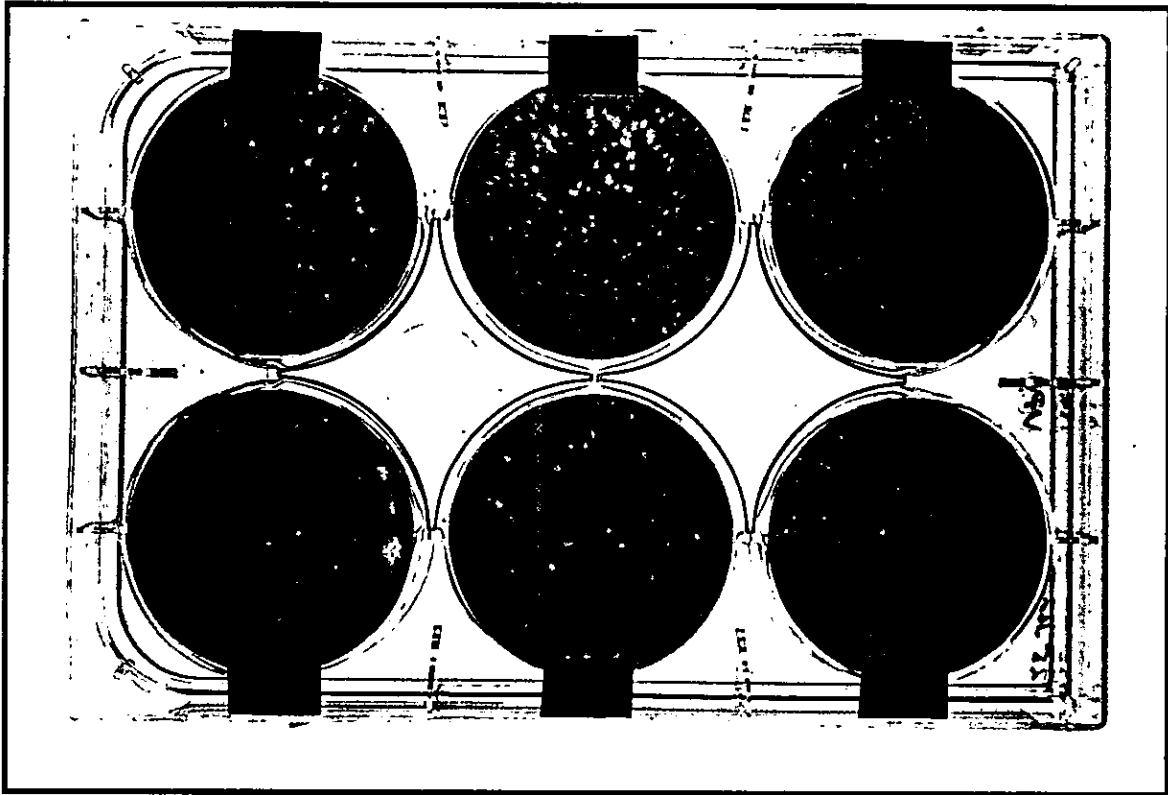


Figura 10. Placas formadas por baculovirus recombinantes sobre una monocapa de células Sf9.

La purificación de los baculovirus recombinantes se realizó mediante tres pases en placa utilizando la técnica anterior.

Los virus recombinantes se seleccionaron por su capacidad de expresar la proteína heteróloga de rotavirus, evaluados por inmunocitoquímica en células Sf9 utilizando anticuerpos policlonales

contra rotavirus. Se adsorbieron células Sf9 en una placa de 24 pozos (Costar) ( $0.4 \times 10^6$  células/pozo) durante media hora a  $27^\circ\text{C}$ , el medio de cultivo se aspiró y se añadieron a las células  $200 \mu\text{l}$  de la suspensión de cada una de las placas aisladas y resuspendidas en el procedimiento anterior, para la adsorción del virus durante 2 h a  $27^\circ\text{C}$ . Después de la adsorción cada uno de los pozos se llevó a un volumen final de 1 ml con medio Hink's conteniendo 10% de FBS. Las células se incubaron 96 h a  $27^\circ\text{C}$ , el medio de cultivo se retiró y las células se dejaron secar durante 5 min a temperatura ambiente, posteriormente las células se fijaron con  $250 \mu\text{l}$  de formaldehído al 3.7% durante 15 min a  $37^\circ\text{C}$ . Las células fijadas se lavaron 1 vez con PBS y se permeabilizaron con  $250 \mu\text{l}$  de Tritón X-100 (SIGMA, Chemical) al 0.5% durante 10 min a  $37^\circ\text{C}$ . Posteriormente, las células se lavaron 1 vez con PBS y se incubaron con  $200 \mu\text{l}$  de anticuerpos policlonales contra rotavirus diluido 1:1000 durante 1 h a  $37^\circ\text{C}$ . Las células se lavaron 2 veces con PBS y se incubaron con  $200 \mu\text{l}$  de proteína A-peroxidasa (Amersham) diluida 1:2000 durante 1 h a  $37^\circ\text{C}$ . Posteriormente las células se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con  $200 \mu\text{l}$  de sustrato (3 ml de una solución al 0.4% de 9-aminoetilcarbazole en dimetilformamida, 9 ml de buffer de acetatos: Acetato de sodio 0.5M-Acido acético 0.5M,  $20 \mu\text{l}$  de peróxido de hidrógeno) durante 15 min a temperatura ambiente. Finalmente, las células se analizaron en un microscopio óptico invertido Nikon Diaphot 300.

Adicionalmente, analizamos la expresión de cada uno de los baculovirus recombinantes por Western blot, utilizando anticuerpos policlonales contra rotavirus.

Los baculovirus recombinantes seleccionados, se amplificaron mediante la infección de cultivos en suspensión de células Sf9. Para realizar este ensayo,  $4 \times 10^8$  células cultivadas en suspensión en frascos "spinners" (Bellco, Biotech.), se resuspendieron en un volumen suficiente para obtener una densidad de  $1 \times 10^7$  células/ml en medio Grace's conteniendo 0.5% de FBS en un tubo de polipropileno de 50 ml (Costar), las células se infectaron con el baculovirus recombinante a una multiplicidad de infección (MOI) de 0.5 unidades formadoras de placa por célula (PFU/célula), los baculovirus recombinantes se adsorbieron a las células durante 2 h a  $27^\circ\text{C}$  en una agitadora de charola a 0.1 ciclos/segundo. Posteriormente, las células se transfirieron a un frasco "spinner" de 250 ml de capacidad y se llevaron a un volumen de 200 ml con medio Hink's conteniendo 10% de FBS,

quedando a una densidad de  $2 \times 10^6$  células/mL. Las células se incubaron durante 120 h a  $27^\circ\text{C}$  con agitación a 90 rpm, la progenie viral se cosechó centrifugando el lisado celular a 1000 rpm durante 10 min en una centrífuga Beckman J2-21, el sobrenadante se recuperó y se almacenó a  $4^\circ\text{C}$ , protegiéndose de la luz hasta su uso.

Cada uno de los stocks virales producidos, se titularon mediante ensayos en placa (placas de 6 pozos, Costar) utilizando el mismo procedimiento que para la purificación de los baculovirus recombinantes. Los ensayos se hicieron por duplicado al menos dos veces. El título viral se determinó como unidades formadoras de placa por unidad de volumen (PFU/mL) mediante la siguiente fórmula:

$$\text{PFU/mL} = \frac{\text{Número de placas}}{(\text{Factor de dilución})(\text{Volumen de inóculo [mL]})}$$

### **Producción y purificación de VLPs**

Para la producción de VLPs se utilizaron los baculovirus recombinantes que expresan de manera independiente las proteínas VP2, VP4, VP6 y VP7. El baculovirus que expresa simultáneamente las proteínas VP2, VP6 y VP7, no se utilizó por razones que se explican más adelante.

Las producción de VLPs se realizó mediante la coinfección de cultivos de células Sf9 en suspensión. Se coinfectaron  $1.4 \times 10^9$  células en un volumen de adsorción de 140 mL de medio Grace's conteniendo 0.5% de FBS en tubos de polipropileno de fondo cónico (Corning) de 250 mL de capacidad, de manera simultánea con cada uno de los baculovirus recombinantes que expresan las proteínas VP2, VP4, VP6 y VP7 a una MOI de 5. El tiempo de adsorción fué de 3 h a  $27^\circ\text{C}$  en una agitadora de charola a 0.1 ciclos/segundo. Las células se centrifugaron en un tubo de polipropileno de 50 ml (Costar) durante 10 min a 1000 rpm en una centrífuga Beckman TJ-6, el inóculo se removió y las células se resuspendieron en un volumen suficiente para obtener una densidad de  $2.5 \times 10^6$  células/ml, con medio Grace's conteniendo 0.5% de FBS en frascos "spinners". Las células se incubaron a 90 rpm durante 144 h a  $27^\circ\text{C}$  en presencia de inhibidores de proteasas, leupeptina ( $2.5 \mu\text{g/mL}$ ) y aprotinina ( $2.5 \mu\text{g/mL}$ ), que se añadieron cada 24 h para minimizar la degradación de las

proteínas recombinantes por acción de proteasas celulares (Labbé *et al.*, 1991; Zeng *et al.*, 1994). El cultivo se cosechó y el medio se clarificó por centrifugación durante 10 min a 1000 rpm en una centrífuga Beckman J2-21. El medio clarificado fué extraído con un volumen igual de freón y centrifugado por 15 minutos a 3000 rpm en una centrífuga Beckman J2-21. La fase acuosa se recuperó y fué cargada sobre un colchón de sacarosa al 35% en buffer TNC (10 mM Tris [pH 7.4], 140 mM NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>) y se centrifugó durante 90 min a 25000 rpm en un rotor SW28 (Beckman) para sedimentar las VLPs contenidas en el medio. Los precipitados se resuspendieron en 200 µl de buffer TNC durante toda la noche a 4°C. Las VLPs se purificaron por ultracentrifugación a equilibrio en gradientes de cloruro de cesio (0.42 gr de CsCl/mL), durante 3 h a 90000 rpm en un rotor TLA-100.4 en una ultracentrífuga Optima (Beckman). Las bandas opalescentes visibles en el gradiente se colectaron con una micropipeta. La fracción correspondiente a las VLPs se diluyó en buffer TNC y se sedimentó por ultracentrifugación durante 120 min a 35000 rpm en un rotor SW50.1 (Beckman), las VLPs se resuspendieron en buffer TNC y se almacenaron a 4°C. La cantidad de proteína se cuantificó por el método colorimétrico de Bradford (Biorad) mediante una curva standard con gama globulina como proteína control, las densidades ópticas se obtuvieron en un lector de ELISA (EL311; Bio-Tec Instruments) a una longitud de onda de 570 nm.

### **Caracterización de las VLPs**

Las propiedades estructurales y funcionales de las VLPs, se analizaron por microscopía electrónica, inmunoblot, ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay), hemaglutinación, ensayos de unión y coentrada de  $\alpha$ -sarcina a células MA104, que a continuación se describen.

### **Microscopía electrónica**

Para determinar la integridad física de las partículas, se colocó una alícuota de VLPs sobre una rejilla de cobre de 400 mallas (SPI, supplies) cubierta con carbón y una película de formvar (Ted Pella, Inc.) conteniendo 0.26% de dicloroetano (1, 2-dicloroetano) como soporte. Las VLPs se adsorbieron sobre la rejilla durante 5 min a temperatura ambiente, el exceso de muestra se retiró por

capilaridad con papel filtro. Posteriormente, las rejillas se tiñeron con ácido fosfotúngstico al 1% pH 6.5 durante 1 min, el exceso de colorante se retiró por capilaridad con papel filtro. Las rejillas se dejaron secar durante 10 min a temperatura ambiente y se examinaron en un microscopio electrónico Zeiss modelo EM900.

### **Inmunoblot**

Las proteínas ensambladas en VLPs se resolvieron en geles desnaturalizantes de poliacríamida al 11%. Las muestras se disociaron por ebullición durante 3 min con buffer de corrida para proteínas (Buffer de muestra de Laemmli 2x: 100 mM Tris pH 6.8, 4% SDS, 0.2% azul de fenol, 20% glicerol; adicionar 10  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol por cada 0.5 ml antes de su uso). Las proteínas separadas por electroforesis, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Immobilon-NC; Millipore) en una electrocámara utilizando tres buffers de transferencia (buffer I: 0.3 M Tris, 20% metanol; buffer II: 0.25 M Tris, 20% metanol; buffer III: 0.25 M Tris, 20% metanol, 40 mM glicina) durante 1 h a corriente constante ( $\text{mA} = \text{área del gel} \times 0.8$ ). La membrana de nitrocelulosa se bloqueó con 5% de leche descremada (Carnation) en PBS conteniendo 0.2% de tween-20, durante 90 min a 37°C ó toda la noche a 4°C. Posteriormente la membrana se lavó 1 vez con 0.1% de leche en PBS conteniendo 0.2% de tween-20 durante 5 min y se incubó con un anticuerpo policlonal contra rotavirus ( $[\alpha\text{YM}]$  1:3000) durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente la membrana se lavó 3 veces durante 5 min y se incubó con un anticuerpo anti-conejo conjugado con peroxidasa ( $\alpha\text{IgG}$ ; 1:4000) durante 90 min a temperatura ambiente. La nitrocelulosa se lavó 3 veces durante 5 min, se colocó en PBS y se reveló con un sustrato quimioluminiscente (Luminol; ECL, Amersham) la señal luminiscente se detectó en placas X-OMAT (Kodak).

Adicionalmente, las VLPs se analizaron bajo este mismo criterio con un anticuerpo monoclonal (HS2; 1:2000) contra la proteína VP4. En cada uno de los ensayos de Western blot se incluyó como control al rotavirus YM.

### **ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)**

La reactividad de un panel de anticuerpos monoclonales y policlonales, se analizó con las VLPs en un ensayo de ELISA con la finalidad de compararse con la reactividad que presentan dichos anticuerpos con el virus. Un anticuerpo policlonal antirotavirus (policlonal 930), obtenido en cabra y un panel de anticuerpos monoclonales (anti-VP4: MAYM1, MAYM9, MAYM10, MAYM13 y 2G4; Anti-VP7: 60 y 159) se utilizaron como anticuerpos de captura en placas de 96 pozos (Costar). Cada uno de estos anticuerpos se utilizaron con el objetivo de conocer en general, que tanto se conservan los epítopes que reconocen dichos anticuerpos en las VLPs con respecto al virus. Los anticuerpos se adsorbieron a la placa de 96 pozos incubándose durante toda la noche a 4°C. Posteriormente la placa se bloqueó con 200 µl/pozo de leche descremada (Carnation) al 2.5% en PBS durante 1 h a 37°C y lavada 3 veces con 200 µl/pozo de una solución de lavado (0.05% Tween-20 en PBS [v/v]). Las VLPs fueron diluidas a una concentración de 1.6 ng/µl en PBS, y 50 µl de esta dilución se añadieron a cada uno de los pozos de la placa incubándose durante 1 h a 37°C. La placa se lavó 3 veces y se añadió un anticuerpo policlonal antirotavirus ( $\alpha$ YM) obtenido en conejo (50 µl/pozo). Después de una incubación de 1 h a 37°C la placa se lavó 3 veces y se añadieron 50 µl/pozo de un anticuerpo de conejo conjugado con peroxidasa ( $\alpha$ IgG; 1:1300), incubándose durante 1 h a 37°C. La placa se lavó 3 veces y 100 µl de sustrato (5 ml buffer de citratos pH 4.5, 5 mg o-fenilendiamina [SIGMA, Chemicals], 2 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [Perydon 35% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; Merck]) fué añadido a cada pozo. Después de 5-10 min de incubación a temperatura ambiente, la densidad óptica se determinó en un lector de ELISA (EL311; Bio-Tek Instruments) a una longitud de onda de 490 nm. Como control se probó la reactividad de los mismos anticuerpos con cantidades equivalentes de proteína del rotavirus YM. Los ensayos se realizaron por duplicado al menos dos veces.

### **Ensayos de hemaglutinación**

Para determinar la capacidad de hemaglutinación de la proteína VP4 ensamblada en VLPs, se hicieron diluciones seriadas 1:2 de dichas partículas en PBS con 0.125% albúmina bovina (BSA; SIGMA, Chemicals) en un volumen final de 50 µl y se colocaron en una placa para microtitulación de 96 pozos de fondo cónico (serocluster "V"; Costar). Posteriormente a cada pozo se agregaron 50 µl

de una suspensión de eritrocitos al 0.4% (40  $\mu$ l de eritrocitos humanos del grupo O, en 10 ml PBS-0.125% BSA). La placa se analizó después de 1 h de incubación a temperatura ambiente (Isa *et al.*, 1997). Cada uno de los ensayos de hemaglutinación, se realizaron por duplicado al menos dos veces.

#### **Ensayos de unión a células MA104**

Cultivos de células MA104 en monocapa, se lavaron 1 vez con EDTA (0.5 mM) y se resuspendieron a una concentración final de  $1 \times 10^6$  células/ml en medio mínimo esencial (MEM) libre de suero. Para los ensayos de unión, se resuspendieron 80 ng de VLPs en un volumen de 100  $\mu$ l de MEM libre de suero en un tubo eppendorf de 1.5 mL, 50  $\mu$ l de la suspensión de células ( $0.5 \times 10^5$  células) se añadieron a las VLPs y se adicionaron 50  $\mu$ l de PBS conteniendo 4% de BSA. Esta suspensión se incubó durante 1 h a 4°C en agitación controlada en un agitador eppendorf (Thermomixer 5436). Posteriormente, las células se lavaron 2 veces con 50  $\mu$ l de PBS conteniendo 0.5 % de BSA, se transfirieron a otro tubo y se lisaron con 50  $\mu$ l de tritón X-100 al 0.1%. Los lisados celulares se transfirieron a una placa de ELISA de 96 pozos (Costar) previamente sensibilizada con un anticuerpo policlonal antirotavirus (policlonal 930; 1:5000) durante 1 h a 37°C y se continuó con el formato de ELISA descrito anteriormente (Crawford *et al.*, 1994; Cuadras *et al.*, 1997). Como control, realizamos ensayos de unión con cantidades equivalentes de proteína del rotavirus YM semipurificado.

#### **Ensayos de inhibición de la unión de VLPs a células MA104**

Las monocapas de células MA104 se resuspendieron a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml de la misma manera que en el protocolo anterior,  $0.5 \times 10^5$  células se preincubaron con diluciones seriadas 1:2 de anticuerpos policlonaes contra rotavirus ( $\alpha$ YM) en un volumen de 100  $\mu$ l durante 1 h a temperatura ambiente. Las células se lavaron 1 vez con 50  $\mu$ l de PBS conteniendo 0.5% de BSA, posteriormente se añadieron a las células 140 ng de VLPs resuspendidas en 100  $\mu$ l de MEM libre de suero y 50  $\mu$ l de PBS conteniendo 4% de BSA, la suspensión se incubó durante 1 h a 4°C en un agitador eppendorf. Las células se lavaron 2 veces, se transfirieron a otro tubo y se continuó con el

formato del protocolo anterior (Cuadras *et al.*, 1997). Como controles utilizamos un suero preinmune y cantidades equivalentes de proteína del rotavirus YM semipurificado. Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición de la unión, tomando como 100% de unión los valores de absorbancia obtenida de los pozos correspondientes a las células que no se preincubaron con los anticuerpos policlonales.

### **Ensayo de permeabilización de células MA104**

La finalidad de este ensayo fué determinar si las VLPs inducen la permeabilización temprana de la membrana celular a la toxina  $\alpha$ -sarcina como medida indirecta de la penetración de dichas partículas a la célula. Este ensayo fué realizado en nuestro laboratorio en colaboración con Mariela Cuadras. En este ensayo se adsorbieron diferentes concentraciones de VLPs a monocapas de células MA104 en placas de cultivo de 96 pozos en presencia de varias concentraciones de  $\alpha$ -sarcina (SIGMA Chemicals). Después de 1 h de adsorción a 37°C, las VLPs y la toxina fueron removidas, MEM libre de suero fué añadido a las células por un periodo de 30 min. Posteriormente, el medio se reemplazó con MEM libre de metionina suplementado con 25  $\mu$ Ci/mL de una mezcla de marcaje (EXPRE<sup>35</sup>S<sup>35</sup>S ; >1000 Ci/mmol [Dupont]), las células se incubaron durante 1 h a 37°C. Después del periodo de marcaje las células se lavaron con PBS, se trataron con 5% de ácido tricloroacético durante 5 min a temperatura ambiente y se lavaron 3 veces con etanol. La monocapa de células se secó bajo una lámpara y se añadieron 50  $\mu$ l de SDS al 0.1% en NaOH 0.1N. La radioactividad total en la muestra se determinó por centelleo solubilizando la muestra en Ecolite (ICN) (Otero & Carrasco *et al.*, 1987; Cuadras *et al.*, 1997).



## RESULTADOS

### Construcción de los vectores de transferencia para baculovirus *pVL1392/YM2*, *pVL1392/YM6*, *pVL1392/YM5'Δ9* y *pAcAB4/YM2/YM6/YM5'Δ9*

Los genes que codifican para las proteínas VP2, VP4\*, VP6 y VP7 del rotavirus YM, se clonaron en el vector de transferencia para baculovirus *pVL1392* (9.6 kb) como se describió en materiales y métodos. La estrategia de clonación se basó esencialmente en los mapas de restricción de cada uno de los genes del rotavirus YM empleados en este trabajo. Los vectores recombinantes que expresan las proteínas VP2, VP6 y VP7 del rotavirus YM, se denominaron: *pVL1392/YM2* (12.3 kb), *pVL1392/YM6* (10.9 kb) y *pVL1392/YM5'Δ9* (10.6 kb) respectivamente [Figs. 5, 6 y 7]. Adicionalmente, construimos el vector de expresión múltiple *pAcAB4/YM2/YM6/YM9* (15.2 kb) que expresa simultáneamente los productos de los genes 2, 6 y 9 del rotavirus YM [Fig. 8]. Cada una de las construcciones fué verificada con las enzimas de restricción apropiadas.

\* Fuentes-Pananá *et al.*, 1995.

### Generación y expresión de los baculovirus recombinantes

Los baculovirus recombinantes denominados bacuYM2, bacuYM6 y bacuYM9 que expresan las proteínas VP2, VP6 y VP7 del rotavirus YM, respectivamente, se generaron mediante un evento de recombinación homóloga entre el vector de transferencia recombinante y el DNA de baculovirus cotransfectados en células Sf9. Como se mencionó anteriormente, el baculovirus que expresa la proteína VP4 de YM fué generado anteriormente (Fuentes-Pananá *et al.*, 1995), motivo por el cual no se le menciona con detalle en materiales y métodos. La expresión de cada uno de los baculovirus recombinantes fué examinada por inmunocitoquímica y por Western blot, confirmando su capacidad para expresar las proteínas de rotavirus correspondientes [Fig. 11]. Los cultivos de células Sf9 se infectaron con cada uno de los baculovirus recombinantes de manera independiente, una alícuota del lisado celular de cada infección fué tomada 48 h post-infección (p. i.), y las proteínas se resolvieron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se analizaron por Western blot con anticuerpos policlonales contra rotavirus ( $\alpha$ YM)

como se indicó en materiales y métodos. Cada una de las proteínas de rotavirus, expresadas por los baculovirus recombinantes, tuvieron el peso molecular esperado y reaccionaron con el anticuerpo policlonal  $\alpha$ YM [Fig. 11] indicando que las proteínas de rotavirus expresadas por estos recombinantes son antigénicamente similares.

Adicionalmente, la proteína VP4 expresada en baculovirus reaccionó con el anticuerpo monoclonal HS2 dirigido contra la proteína VP4 del virus [Fig. 11], confirmando la existencia de epítopes de la VP4 nativa en las VLPs. La proteína VP4 recombinante se observó como un doblete, sin embargo, estudios realizados en nuestro laboratorio por E. Fuentes revelaron que la banda inferior de dicho doblete corresponde a la proteína VP4 presente en la partícula viral (Fuentes-Panana *et al.*, 1995). Además de las proteínas recombinantes, se observaron dos bandas adicionales de menor intensidad con un peso molecular de aproximadamente 40 y 70 kilodaltones (kDa), respectivamente. La banda de 40 kDa (carriles 1, 2, 5, 7), corresponde a una proteína de origen celular que presenta reacción cruzada con el anticuerpo policlonal; el hecho de que esta proteína no se haya observado en los carriles 3 y 4 fué debido a que la cantidad de lisado celular, corrido en estos carriles, fué mucho menor (1/15) con el objetivo de tener una mejor resolución de las proteínas VP4 y VP6, correspondientes a estos carriles, ya que dichas proteínas se expresan en mucho mayor cantidad que VP2 y VP7 (carriles 1, 2 y 5). Esta conclusión fué apoyada por el hecho de que en células sin infectar la única banda presente fué la de aproximadamente 40 kDa (carril 7).

Por otro lado, la banda de aproximadamente 70 kDa, corresponde a una proteína de baculovirus que también presenta reacción cruzada con el anticuerpo policlonal, esta conclusión fué factible debido a que dicha banda fué la única que se detectó en células infectadas con un baculovirus silvestre (carril 6). La ausencia de esta banda en los carriles 4 y 5 también se debió, como en el caso anterior, a la poca cantidad de lisado corrido en dichos carriles. Tanto la banda de 70 kDa como la de 40 kDa no se detectaron con el anticuerpo monoclonal HS2 (Fig. 11).

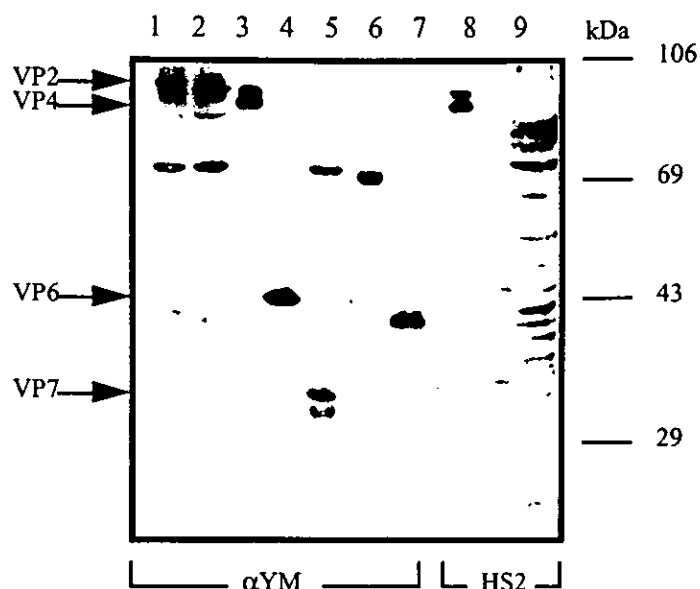


Figura 11. Western blot de las proteínas de rotavirus expresadas en células de insecto (Sf9) por baculovirus recombinantes. Cultivos de células Sf9 fueron infectadas con los baculovirus recombinantes: bacuYM2 (1), bacuRF2 (2), bacuYM4 (3), bacuYM6 (4) y bacuYM9 (5). Células infectadas con un baculovirus silvestre (6) y células sin infectar (7 y 9) fueron utilizadas como controles. Las membranas de nitrocelulosa se revelaron con un anticuerpo policlonal anti-rotavirus ( $\alpha$ YM [carriles 1-7]) y un anticuerpo monoclonal (HS2 [carriles 8 y 9]) dirigido contra la región carboxilo de la proteína VP4, las proteínas expresadas se señalan.

### Producción y purificación de VLPs

Previamente a la producción de VLPs, corroboramos la expresión de los baculovirus recombinantes [Fig. 11] y se determinó el título viral de cada uno de ellos (materiales y métodos).

Para la producción de VLPs se coinfectaron cultivos de células Sf9 con los baculovirus recombinantes bacuYM2, bacuYM4, bacuYM6 y bacuYM9. En una serie de coinfecciones iniciales realizadas independientemente, la coexpresión de los baculovirus recombinantes no resultó en la formación de VLPs, juzgada por la ausencia de bandas en los gradientes de cloruro de cesio. Esta observación inesperada reveló la existencia de un problema con alguno de los componentes del sistema. Se detectó que la ausencia de ensamble de las partículas, se debía a una baja expresión y a una alta susceptibilidad a la degradación proteolítica de la proteína VP2. La susceptibilidad de la VP2 a

la degradación ha sido reportada (Zeng *et al.*, 1994), sin embargo, la proteína VP2 de YM expresada en baculovirus resultó ser mucho más sensible de lo reportado a la acción de proteasas celulares (Labbé *et al.*, 1991; Zeng *et al.*, 1994). La incapacidad de la VP2 recombinante de YM para formar VLPs, se comprobó al observar que la producción de VLPs con las proteínas VP4, VP6 y VP7 de otra cepa de rotavirus (SA11), utilizando el bacuYM2, fué ineficiente; no así cuando se utilizó un baculovirus recombinante que expresa la proteína VP2 del rotavirus bovino RF (bacuRF2, donado por M. K. Estes, Baylor College of Medicine, Houston Tx.). Más aún, para confirmar que la proteína VP2 de YM era responsable de un ensamblaje ineficiente, realizamos dos coinfecciones paralelas e independientes en las que el baculovirus recombinante que expresa VP2 fué el único cambio, utilizando VP2 de YM o de RF. Los productos se purificaron en gradientes a equilibrio de cloruro de cesio, las tres bandas opalescentes de diferente densidad (bandas 1, 2 y 3) se analizaron por Western blot con anticuerpos policlonales antirotavirus [Fig. 12]. Aunque se sabe que la banda 3 corresponde a las VLPs formadas por las proteínas VP2, VP4, VP6 y VP7 (VLPs completas o triple capa) se decidió analizar la composición proteínica de las otras dos bandas (1 y 2). Los resultados mostraron que el ensamble de VLPs solo se obtuvo al coinfectar con el baculovirus recombinante que expresa la proteína VP2 de RF [Fig. 12]. Así, decidimos producir VLPs coinfectando con los recombinantes bacuRF2, bacuYM4, bacuYM6 y bacuYM9. De tal manera que todos los estudios de caracterización que se describen en este trabajo se realizaron con VLPs que contienen la proteína VP2 del rotavirus bovino RF y las proteínas VP4, VP6 y VP7 del rotavirus YM.

Por otro lado, debido a que el ensamble de VLPs utilizando la proteína VP2 de YM fué ineficiente, por las razones ya mencionadas, se decidió no utilizar el vector de expresión múltiple *pAcAB4/YM2/YM6/YM5'Δ9* que contiene dicho gene. Sin embargo, existe la posibilidad de reemplazar el gene 2 de YM por el gene 2 de RF y utilizar el vector de expresión múltiple para la producción de VLPs en estudios posteriores.

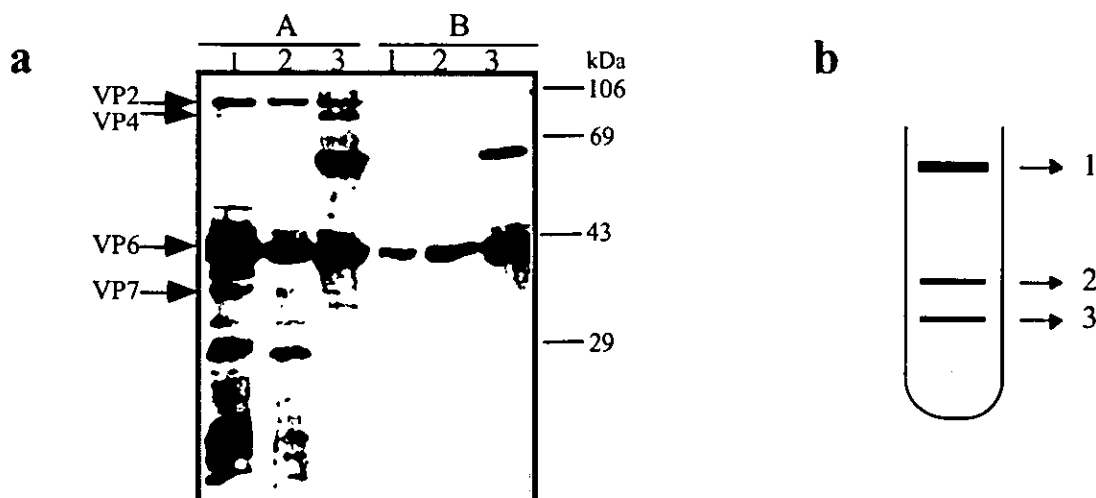


Figura 12. (a) Western blot de los productos obtenidos en los gradientes de cloruro de cesio de dos coinfecciones paralelas e independientes de células Sf9, utilizando los baculovirus recombinantes bacuRF2, bacuYM4, bacuYM6 y bacuYM9 (A); y los baculovirus recombinantes bacuYM2, bacuYM4, bacuYM6 y bacuYM9 (B). En este ensayo se utilizó un anticuerpo policlonal antirotavirus ( $\alpha$ YM), se analizaron las tres bandas opalescentes (1, 2 y 3) obtenidas en los gradientes (b).

La coinfección de células Sf9 con los virus recombinantes bacuRF2, bacuYM4, bacuYM6 y bacuYM9, resultó en la coexpresión y ensamble de las proteínas en VLPs. En los gradientes de equilibrio de cloruro de cesio fueron visibles las bandas ya mencionadas, las dos bandas inferiores, las cuales se denominaron banda ligera (2) y banda pesada (3) fueron fraccionadas y resuspendidas en buffer TNC, la cantidad de VLPs obtenida en cada banda fué cuantificada por el método de Bradford (Biorad).

El rendimiento obtenido de VLPs fué de aproximadamente 570 ng de proteína correspondiente a la fracción de VLPs completas (banda pesada) y 500 ng correspondientes a la fracción de VLPs incompletas (banda ligera) por cada  $10^6$  células infectadas.

La experiencia que se tiene en nuestro laboratorio en la producción de dichas partículas, demuestra que el rendimiento obtenido de VLPs fué razonable, ya que en trabajos previos la cantidad promedio de VLPs obtenida fué de 60 ng por cada  $10^6$  células infectadas (Cuadras, 1998). No se

descarta la posibilidad de que esta eficiencia pueda ser incrementada considerablemente implementando estrategias de control durante la infección de los cultivos celulares, tales como el suministro controlado de oxígeno, la remoción de desechos metabólicos y el suministro de nutrientes. Otra alternativa que puede resultar en mejores rendimientos de producción, es la utilización de baculovirus recombinantes de expresión múltiple. También es importante tomar en cuenta que la eficiencia de producción de VLPs puede variar entre diferentes cepas de rotavirus y con ciertas asociaciones de proteínas de diferente cepa (VLPs quiméricas).

## **CARACTERIZACION DE VLPs**

### **Integridad física de las partículas**

La integridad física de las partículas fué examinada por microscopía electrónica mediante tinción negativa. La apariencia física de las VLPs, vistas al microscópio electrónico, fué similar a la morfología de las partículas de rotavirus nativos [Fig. 13]. No observamos diferencia significativa entre el diámetro de las VLPs y el diámetro de las partículas del rotavirus YM, aunque fué claro que el colorante penetró a las pseudopartículas debido a la ausencia del RNA viral.

### **Composición proteica de las VLPs**

Para corroborar que las proteínas que conforman la cápside de rotavirus, expresadas en baculovirus, fueron ensambladas en VLPs y que conservan propiedades antigénicas similares a los rotavirus nativos, se realizó un ensayo de Western blot con anticuerpos policlonales contra rotavirus ( $\alpha$ YM). Se confirmó la presencia de las proteínas VP2, VP4, VP6 y VP7 en las partículas expresadas con el anticuerpo policlonal  $\alpha$ YM [Fig. 14]. Estos resultados corroboraron que la composición proteínica de las VLPs está constituida por las proteínas VP2, VP4, VP6 y VP7. Adicionalmente, la proteína VP4 que es la menos abundante en las partículas y que tiene un patrón de migración cerca de VP2, se identificó con el anticuepo monoclonal HS2 dirigido contra dicha proteína. Tanto la proteína

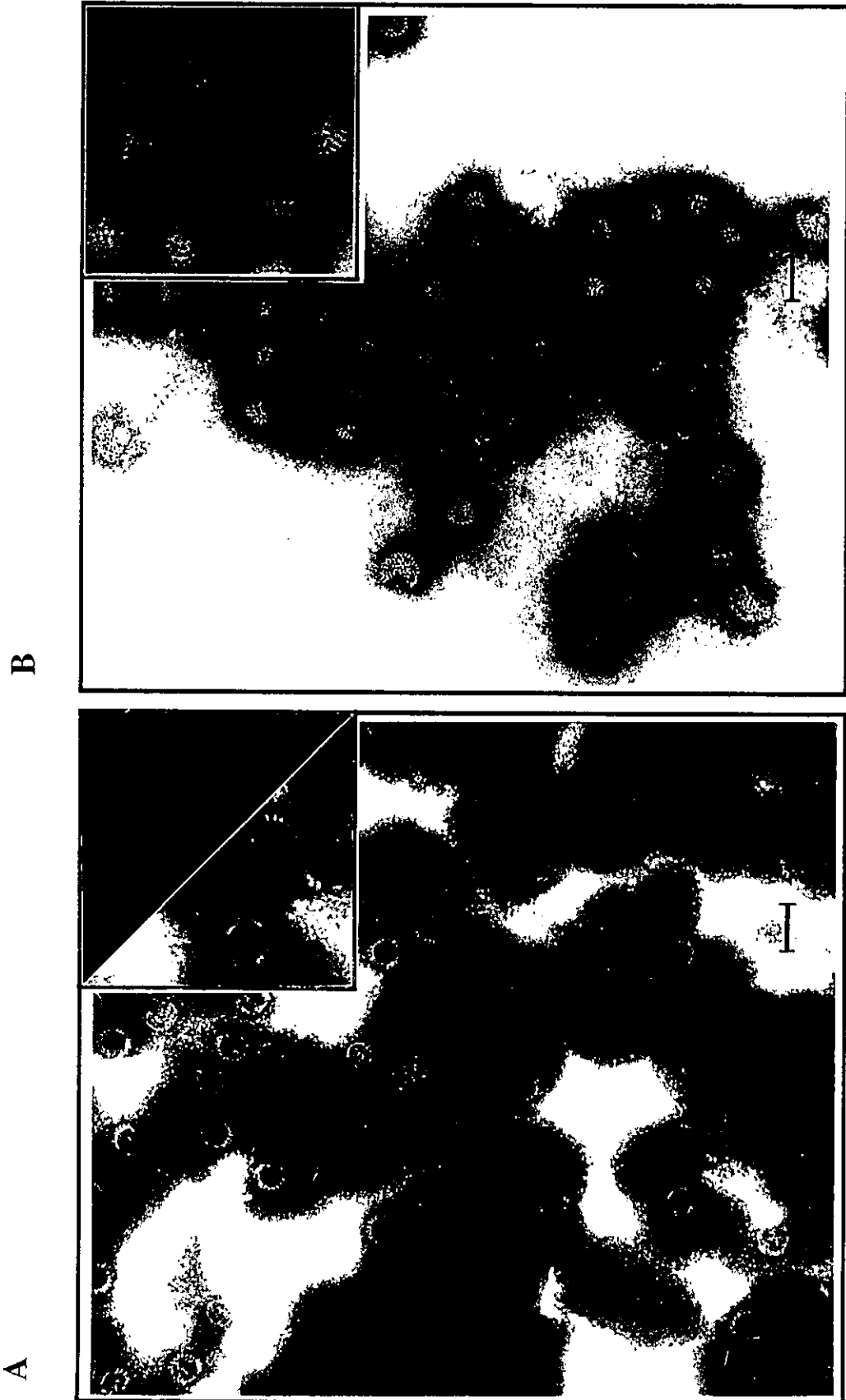


Figura 13. Imágenes de microscopía electrónica (tinción negativa) que revelan la integridad física de las VLPs (A) y su similitud con las partículas de rotavirus (B). La tinción del centro de las VLPs es debida a la ausencia de RNA (A). La barra equivale a 100 nm de longitud.

VP4 como uno de los polipéptidos (VP5), producto del corte con tripsina, se identificaron bajo este criterio [Fig. 14].

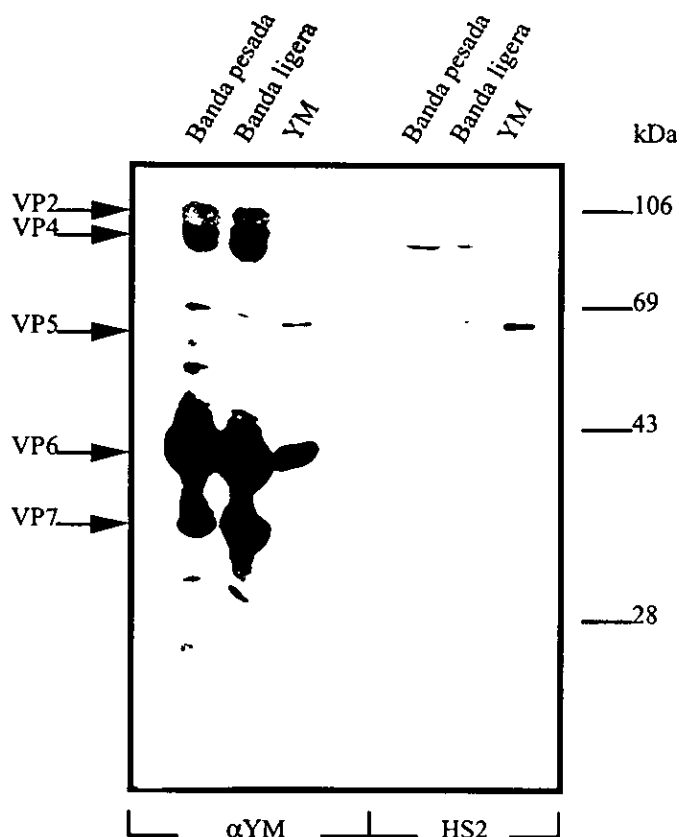


Figura 14. Composición proteínica de las VLPs analizada por Western blot. Las proteínas VP2, VP4, VP6 y VP7 se identificaron con un anticuerpo policlonal antirotavirus ( $\alpha$ YM); adicionalmente la proteína VP4, así como la proteína VP5 producto del corte con tripsina, se identificó con un anticuerpo monoclonal (HS2) dirigido contra la parte carboxilo de VP4. Las bandas fraccionadas del gradiente de cloruro de cesio, que corresponden a las VLPs incompletas (banda ligera) y a las VLPs completas (banda pesada) fueron analizadas con ambos anticuerpos. Como control se utilizó el virus nativo (YM).

### Propiedades antigénicas de las VLPs

Para comparar las características antigénicas de las VLPs obtenidas, con las del virus nativo, se realizaron ensayos de ELISA en el que las VLPs se capturaron con un panel de anticuerpos



monoclonales anti VP4: MAYM1, MAYM9, MAYM10, MAYM13 y 2G4; anti VP7: MAb-60 y MAb-159; y un anticuerpo policlonal anti-rotavirus (policlonal 930). Como se mencionó en materiales y métodos, se utilizaron todos estos anticuerpos con la finalidad de comparar la reactividad de cada uno de ellos con las VLPs, respecto al grado de reactividad que presentan con el virus nativo. Esta estrategia dió una idea general de que tanto se conservan los epítopes reconocidos por dichos anticuerpos en las VLPs.

La reactividad de las VLPs con los anticuerpos monoclonales contra VP4, fué considerablemente baja comparada con la reactividad que presentaron dichos monoclonales con el rotavirus nativo YM [Fig. 15]. Se descartó que la baja reactividad de los anticuerpos monoclonales fuese por diferencias en la cantidad de proteína de VLPs y el rotavirus YM utilizadas en el ensayo, al observar que el anticuerpo policlonal 930 reaccionó de manera similar con ambas preparaciones [Fig. 15]. Por otro lado, el anticuerpo monoclonal 60 dirigido contra la proteína VP7, también reaccionó de manera similar. Otro anticuerpo monoclonal (MAb-159) dirigido contra la proteína VP7 de un serotipo diferente al del rotavirus YM, también reaccionó con las VLPs [Fig. 15]. La baja reactividad de los anticuerpos monoclonales anti VP4 con dichas partículas podría explicarse pensando que existen posibles cambios conformacionales en la proteína VP4 de las VLPs.

En conjunto, estos resultados sugieren que durante el ensamble de las VLPs, pueden ocurrir cambios en la conformación de las proteínas que impiden la exposición de epítopes que normalmente están expuestos en las proteínas del virus. Este hecho también podría explicar la alta reactividad del anticuerpo monoclonal 159 con las VLPs. Fué evidente que la coexpresión de las proteínas VP4, VP6, y VP7 del rotavirus YM y la proteína de la nucleocápside de RF, en células de insecto, resulta en el ensamblaje de las VLPs y que a pesar de que puede haber ligeros cambios conformacionales en dichas partículas, éstas conservan algunas de las propiedades antigénicas de los rotavirus nativos.

### **Hemaglutinación**

El rotavirus porcino YM tiene la capacidad de aglutinar eritrocitos, por lo que analizamos la capacidad de las VLPs para hemaglutinar, utilizando eritrocitos humanos del grupo O. El resultado de

este ensayo reveló la incapacidad de las VLPs para hemaglutinar, ya que aún a altas concentraciones de proteína (500 ng/μl) no se detectó hemaglutinación. El rotavirus YM utilizado como control, tuvo un título de hemaglutinación de 1:320. Este resultado fué inesperado ya que la expresión de la proteína VP4 de YM en células de insecto presenta actividad de hemaglutinación (Fuentes-Pananá *et al.*, 1995).

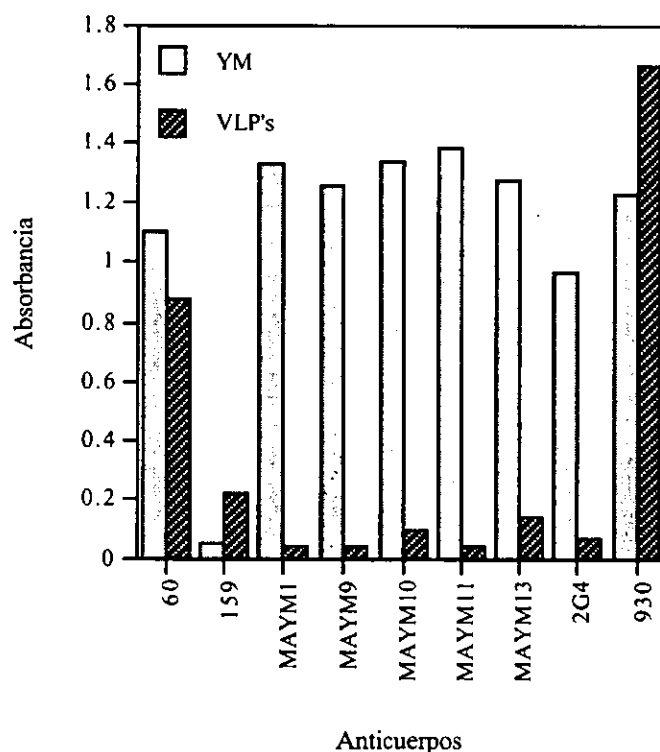


Figura 15. Reactividad antigénica de las VLPs con un panel de anticuerpos mono y policlonales, analizada por ELISA. Anticuerpos monoclonales anti VP4: MAYM1, MAYM9, MAYM10, MAYM11, MAYM13 y 2G4; anti VP7 MAb-60 y MAb-159; anticuerpo policlonal antirotavirus 930.

La baja reactividad de los anticuerpos monoclonales anti-VP4 con las VLPs y la incapacidad de dichas partículas para hemaglutinar, sugiere nuevamente que existen cambios conformacionales entre las VLPs y las partículas virales nativas y que la actividad de hemaglutinación es dependiente de la conformación de la proteína VP4. La actividad de hemaglutinación de las VLPs, también podría verse afectada por la cantidad de la VP4 presente en las partículas.

### Unión de las VLPs a células MA104

Los rotavirus de origen animal se unen de una manera específica a las células MA104. En los ensayos de unión encontramos que las VLPs son capaces de unirse específicamente a la superficie de las células MA104. Esta unión fué dependiente de la dosis de VLPs, siguiendo un patrón de unión similar al que se observa con los rotavirus nativos [Fig. 16]. La especificidad de unión fué demostrada al preincubar las VLPs con anticuerpos policlonales antirotavirus. Los anticuerpos inhibieron la unión de dichas partículas a la célula de manera similar a como inhiben la unión de los rotavirus [Fig. 17]. Este efecto fué dependiente de la concentración de anticuerpo, demostrando que la unión de las VLPs depende de las proteínas virales y que por lo tanto es específica. Este resultado aparentemente contrasta con los resultados obtenidos en los ensayos de hemaglutinación, sin embargo, esto puede explicarse si pensamos que la sensibilidad de cada uno de los sistemas es diferente.

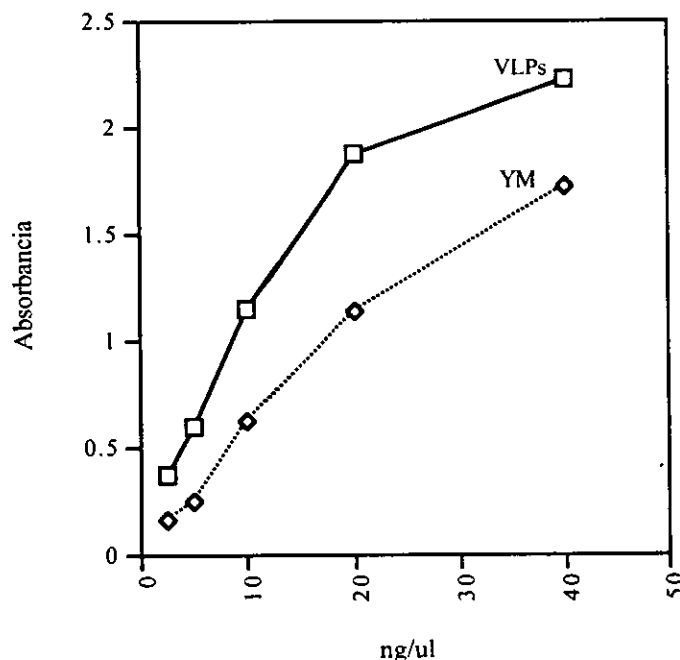


Figura 16. Unión de las VLPs a células MA104. Los ensayos de unión con cantidades equivalentes de proteína de VLPs y rotavirus YM, demostraron que las VLPs se unen a la célula de una manera dosis dependiente similar al patrón de unión del virus.

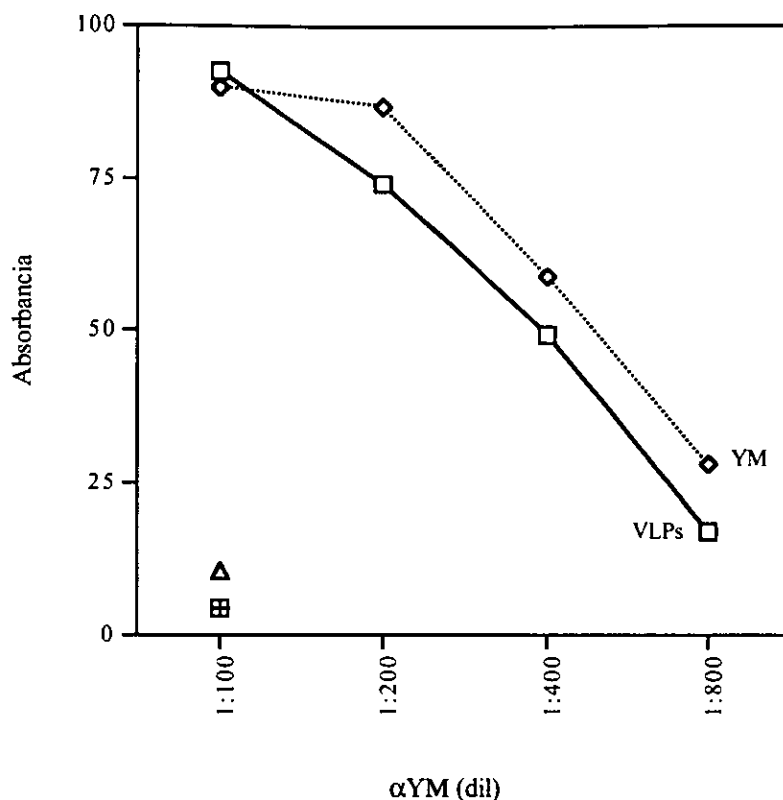


Figura 17. Inhibición de la unión de VLPs a células MA104. La unión de las VLPs a la célula fué inhibida al preincubar las células con un anticuerpo policlonal antirotavirus ( $\alpha$ YM), siguiendo un patrón de inhibición similar a la del rotavirus YM. La inhibición de la unión fué dependiente de la concentración de anticuerpo, demostrando que la unión de las VLPs a la célula es específica. Un suero preinmune no presentó efecto sobre la unión de las VLPs ( $\boxplus$ ) ni sobre la unión del virus ( $\Delta$ ) a la concentración más alta de anticuerpo (1:100).

### Coentrada de $\alpha$ -sarcina a la célula inducida por las VLPs

Durante la infección, los rotavirus inducen una permeabilización temprana de la membrana celular (Cuadras *et al.*, 1997). Esta permeabilización facilita la coentrada de algunas macromoléculas a la célula. Estudiamos si las VLPs son capaces de inducir esta permeabilización temprana de la membrana, medida por la coentrada de la toxina  $\alpha$ -sarcina a la célula. La  $\alpha$ -sarcina es una ribonucleasa que al entrar a la célula inhibe la síntesis de proteínas. En este ensayo encontramos que las VLPs promueven la coentrada de  $\alpha$ -sarcina a la célula, como lo hacen los rotavirus nativos. Este

efecto fué dependiente de la concentración de VLPs [Fig. 18]. Además dicha permeabilización fué dependiente del tratamiento de las partículas con tripsina, ya que cuando la toxina se añadió en presencia de VLPs activadas con la proteasa, hubo una reducción considerable en la síntesis de proteínas celulares medida por la incorporación de  $^{35}\text{S}$ -Met. Se observó una ligera permeabilización, inducida por las VLPs no activadas con tripsina, debida probablemente a una pequeña fracción de proteína VP4 que ya estuviese cortada en las VLPs.

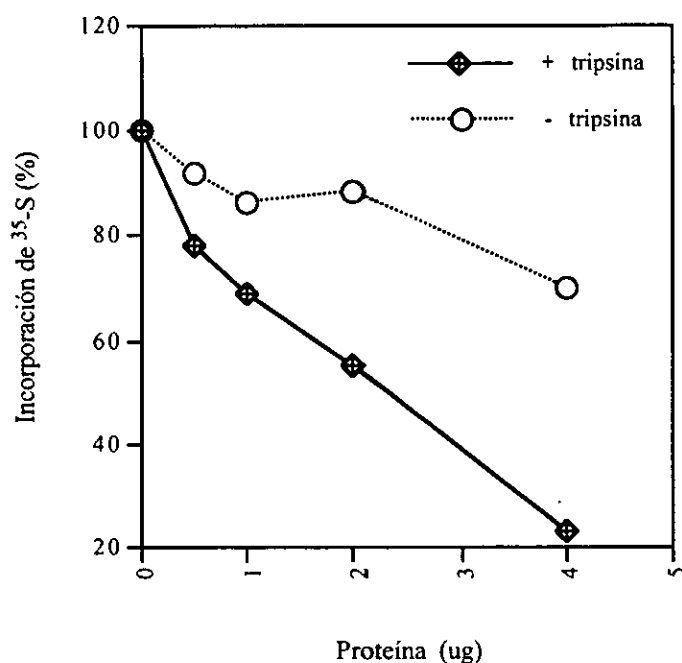


Figura 18. Coentrada de  $\alpha$ -sarcina a células MA104 inducida por las VLPs. La permeabilización temprana de la membrana celular fué inducida por las VLPs de una manera dosis dependiente, facilitando la coentrada de  $\alpha$ -sarcina a la célula medida por la incorporación de  $^{35}\text{S}$ -met.

## DISCUSION Y CONCLUSIONES

Uno de los principales intereses de nuestro laboratorio es caracterizar los diferentes eventos de la replicación de los rotavirus que ocurren durante la infección. En especial existe el interés de estudiar los primeros eventos del virus con su célula huésped tales como la adsorción y la penetración, etapas en las que las proteínas de la capa externa, VP4 y VP7, juegan un papel muy importante. El estudio de estas etapas, así como el estudio de la morfogénesis viral ha sido limitado, debido en parte a que aún no existe un sistema de genética reversa en rotavirus que nos permita mutagenizar un gene específico y recuperarlo dentro de una partícula infecciosa para estudiar su fenotipo. Las VLPs descritas en este trabajo, pueden contribuir a disminuir estas limitaciones ya que dichas partículas conservan propiedades estructurales y funcionales de los rotavirus nativos (Crawford *et al.*, 1994) mimetizando algunos eventos de la infección viral y pueden ser utilizadas, en algunos casos, como un sistema alternativo para el estudio de ciertas propiedades del virión.

En base a los antecedentes de Crawford y colaboradores, implementamos en nuestro laboratorio el sistema de ensamble de VLPs, coexpresando las proteínas VP2 del rotavirus bovino RF y las proteínas VP4, VP6 y VP7 del rotavirus porcino YM, en células de insecto, utilizando el sistema de expresión de baculovirus.

Inicialmente se intentó producir VLPs coexpresando los genes 2, 4, 6 y 9 de la cepa YM, que codifican para las proteínas VP2, VP4, VP6 y VP7 respectivamente, sin embargo, se observó de manera repetitiva que la proteína VP2 de YM se expresó en pequeñas cantidades y sumado a esto, la proteína fué más susceptible de lo esperado a la acción de proteasas del medio y/o celulares. Debido a estas características particulares de la proteína VP2 de YM, se decidió producir las VLPs utilizando un baculovirus recombinante que expresa la proteína VP2 de la cepa de rotavirus bovino RF. El papel de esta proteína como primer pilar estructural fué crucial para el ensamble de las VLPs. Se ha reportado que la coinfección de células de insecto con baculovirus recombinantes que codifican para las proteínas VP6 y VP7, resulta en la formación de VLPs y que la interacción entre estas proteínas es suficiente para la formación de dichas partículas aún en la ausencia de VP2, sin embargo, no se han caracterizado bioquímicamente, por lo que no se conoce su estabilidad y por lo tanto el papel que

tiene la proteína VP2 en el ensamblaje y la correcta estructuración de estas VLPs (Sabara *et al.*, 1991; Redmond *et al.*, 1993). Por otro lado, Crawford y colaboradores también han observado que las partículas formadas por VP6 y VP7 del rotavirus de simio SA11, forman VLPs cuyas poblaciones son heterogéneas e inestables (Crawford *et al.*, 1994).

Las VLPs producidas en este trabajo se caracterizaron con la finalidad de analizar su grado de homología bioquímica y funcional con respecto al rotavirus YM. El análisis de la composición proteica de las VLPs por Western blot, con anticuerpos policlonales y monoclonales, corroboró que las proteínas VP2, VP4, VP6 y VP7 estaban incorporadas en dichas partículas; los pesos moleculares e inmunoreactividad fué similar a las proteínas auténticas de rotavirus. Sin embargo, la conformación de estas proteínas en las VLPs no fué del todo homóloga a la del virus nativo, ya que por ensayos de ELISA, el panel de anticuerpos monoclonales dirigidos contra la proteína VP4 tuvieron una baja reactividad con dichas partículas.

Por otro lado, las VLPs de YM no conservaron su capacidad para hemaglutinar. Lo que sugiere que aunque la VP4 se encuentra presente en las VLPs (por los ensayos de Western blot), esta proteína ó está en una conformación diferente a la del virus ó se encuentra en una proporción menor a la que se encuentra en el virus. Esto podría ser resultado de que las VLPs se producen por una vía de ensamble diferente a la que usan los rotavirus en su célula huésped, ya que en las células de insecto no se encuentran las proteínas no estructurales de rotavirus que tienen un papel importante en la morfogénesis del virus. Factores celulares presentes en las células MA104, pero no en las células de insecto también podrían inducir cambios conformacionales de las proteínas expresadas y variaciones en el ensamblaje de las VLPs. Esta hipótesis tiene relación con la observación de que el anticuerpo monoclonal 159, dirigido contra la proteína VP7 de un virus de serotipo diferente al de la cepa YM, y que normalmente no reacciona con esta cepa, reaccionó con las VLPs obtenidas en este trabajo.

A pesar de no tener actividad de hemaglutinación, encontramos que las VLPs son capaces de unirse de manera específica a las células MA104. El hecho de que no conservaran la capacidad para hemaglutinar pero si su capacidad para unirse de manera específica a la célula, sugiere que el ensayo de unión de estas partículas a la célula es más sensible en cuanto a los requerimientos de estructura y

cantidad de la VP4 presente en las VLPs que el ensayo de hemaglutinación, aunque no se descarta la posibilidad de que estas VLPs se pudiesen estar uniendo a la célula a través de una interacción independiente de ácidos siálicos, sin embargo, se necesitan pruebas adicionales para validar esta hipótesis. Esta idea es factible dada la capacidad que tienen los rotavirus de origen humano de unirse a la célula a través de una interacción siálico-independiente.

Recientemente Cuadras y colaboradores, demostraron que al igual que en otros sistemas virales, los rotavirus inducen la permeabilización temprana de la membrana celular promoviendo la coentrada de la toxina  $\alpha$ -sarcina a la célula, como medida de la penetración viral al citoplasma celular (Cuadras *et al.*, 1997). En poliovirus y en otros sistemas virales la coentrada de  $\alpha$ -sarcina a la célula, depende de la interacción específica del virus con su receptor (Otero & Carrasco *et al.*, 1987). En colaboración con Mariela Cuadras se demostró que las VLPs son capaces de inducir la permeabilización temprana de la membrana. La permeabilización a  $\alpha$ -sarcina mediada por las VLPs fué dependiente de la cantidad de partículas en el ensayo; esta permeabilización también fué dependiente de la activación proteolítica de las VLPs con tripsina. Esta observación es muy importante ya que sugiere que las partículas, independientemente de que presenten algún cambio conformacional en las proteínas VP4 y VP7, contienen los elementos necesarios para interactuar con los componentes celulares que inducen su internalización hacia el citoplasma.

El sistema de ensamble de VLPs brinda amplias oportunidades para estudiar las etapas del ensamble viral, las contribuciones de cada uno de los componentes de la cápside en este evento, y más finamente, la identificación de los sitios que interactúan específicamente para mantener la arquitectura y función viral. El conocimiento de estas interacciones entre las proteínas estructurales de los rotavirus, podría contribuir a desarrollar estrategias moleculares efectivas que interfieran en el ensamble del virus durante la infección.

Por otro lado, dado que las VLPs conservan propiedades antigénicas similares a los rotavirus y su capacidad de inducir inmunidad protectora en ratones y conejos (Crawford *et al.*, 1994; Conner *et al.*, 1997; Ciarlet *et al.*, 1997), ofrecen la posibilidad de ser utilizadas como vacunas contra rotavirus. A pesar de que existe una gran variedad de serotipos, una respuesta heterotípica podría



inducirse de manera efectiva utilizando una mezcla de partículas de diferentes serotipos, o bien, utilizando VLPs quiméricas.

La metodología presentada en este trabajo esta siendo ampliamente explotada en diversos sistemas virales para el estudio de los requerimientos estructurales necesarios para el ensamble, la determinación de estructuras tridimensionales de VLPs ensambladas con proteínas mutantes y su implicación en la arquitectura de la partícula y en el desarrollo de antígenos que induzcan protección. En el caso de rotavirus este sistema ha resultado ser una herramienta potencial para estudiar algunos eventos del ciclo de replicación *in vitro* que han sido limitados por la falta de un sistema de genética reversa, tales como la expresión de complejos con actividad de replicasa, el mapeo de señales en *cis* que promueven la replicación del genoma viral y el mapeo de regiones en las proteínas del core que interactúan como pre-requisito para llevar a cabo alguna función, tal como la replicación viral (Chen *et al.*, 1994; Patton *et al.*, 1996; Wentzet *et al.*, 1996; Zeng *et al.*, 1998).

## APENDICE

### Medios de cultivo, buffers y reactivos.

#### Medio Grace's

|   |        |
|---|--------|
| Agua destilada (dH <sub>2</sub> O)            | 900 mL |
| Medio Grace's (GIBCO BRL; Cat. No. 11300-043) | 47.5 g |
| NaHCO <sub>3</sub>                            | 0.35 g |
| CaCl <sub>2</sub>                             | 0.75 g |
| Ajustar pH con KOH 10 N                       | 6.1    |
| dH <sub>2</sub> O c. b. p.                    | 1 L    |

#### Medio Hinks:

|  |          |
|--|----------|
| dH <sub>2</sub> O  | 900 mL   |
| Medio Grace's (GIBCO BRL; Cat. No. 11300-043)                | 47.5 g   |
| NaHCO <sub>3</sub>   | 0.35 g   |
| CaCl <sub>2</sub>  | 0.75 g   |
| Ajustar pH con KOH 10 N                                      | 6.1      |
| Solución de Yeastolato (GIBCO BRL; Cat. No. 18190-041)       | 16.75 mL |
| Hidrolizado de lactoalbumina (GIBCO BRL; Cat. No. 11800-026) | 3.33 g   |
| Suero Fetal Bovino (FBS)                                     | 10%      |
| dH <sub>2</sub> O c. b. p.                                   | 1 L      |

#### Buffer de fosfatos-salina (PBS)

|                                 |      |  |
|---------------------------------|------|--|
| Stock 10x, 1 L                  |      | <i>Solución, pH ~7.3:</i>              |
| NaCl                            | 80 g | 137 mM NaCl                            |
| KCl                             | 2 g  | 2.7 mM KCl                             |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 2 g  | 1.4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> |

|   |        |  |
|---|--------|--|
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 11.5 g | 4.3 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ |
| $\text{CaCl}_2$                                     | 1 g    |  |
| $\text{MgCl}_2$                                     | 1 g    |  |

**Buffer de citratos 0.1M *pH* 4.5**

Citrato de sodio 7.35 g/0.25 L

Acido cítrico 5.25 g/0.25 L

Medir *pH* al ácido cítrico y ajustar a *pH* 4.5 con la solución de citrato

**Buffer TMSC**

Tris *pH* 8 0.02 M

$\text{MgCl}_2$  0.001 M

$\text{NaCl}$  0.15 M

$\text{CaCl}_2$  0.01 M

**Buffer TNC *pH* 7.5**

Tris HCl 10 mM

$\text{NaCl}$  140 mM

$\text{CaCl}_2$  10 mM

**Buffer de dietanolamina *pH* 9**

Dietanolamina 10 mL/L

$\text{MgCl}_2$  0.2 g/L

Azida de sodio 0.29 g/L

**Buffer de acetatos para carbazole**

$\text{CH}_3\text{COONa}$  0.5M 5 vol

|                      |      |          |
|----------------------|------|----------|
| CH <sub>3</sub> COOH | 0.5M | 1 vol    |
| H <sub>2</sub> O     |      | 31.5 vol |

### Mezcla de transfección para células Sf9

A:   vector de transferencia       250 ng  
       baculogold (Pharmingen)     50 ng  
       dH<sub>2</sub>O c.b.p.                 20 µl  
       Incubar 15 min a temperatura ambiente

B:   Celfectina (GIBCO BRL; Cat. No. 10362-010)   6 µl  
       Grace's   100 µl

Añadir la mezcla B a la mezcla A

Incubar 15 min a temperatura ambiente

Añadir 550 µl de Grace's

La mezcla se transfiere a la monocapa de células como se describe en materiales y métodos.

### Reactivos biológicos

Células Sf9

*Escherichia coli* JM101

Rotavirus porcino YM

Plásmidos:   pVL1392 (Pharmingen)

              pAcAB4 (Pharmingen)

DNA de baculovirus (Baculogold; Pharmingen)

Anticuerpos:

| <u>Anticuerpo</u> | <u>Proteína blanco</u> | <u>Característica</u>     |
|-------------------|------------------------|---------------------------|
| 159               | VP7                    | monoclonal, neutralizante |

|             |     |                              |
|-------------|-----|------------------------------|
| 60          | VP7 | monoclonal, no neutralizante |
| 2G4         | VP5 | monoclonal, neutralizante    |
| MAYM1       | VP4 | monoclonal, neutralizante    |
| MAYM9       | VP4 | monoclonal, neutralizante    |
| MAYM10      | VP4 | monoclonal, neutralizante    |
| MA1M13      | VP4 | monoclonal, neutralizante    |
| 930         |     | Policlonal, neutralizante    |
| $\alpha$ YM |     | Policlonal, neutralizante    |

Oligonucleótidos sintéticos:

|         |                                 |
|---------|---------------------------------|
| Oligo 1 | 5'CAG AAT TCT AAG ATC TGA TAT3' |
| Oligo 2 | 5'ATT TAG GTG ACA CTA TAG3'     |

## REFERENCIAS

- Arias, C. F., Romero, P., Alvarez, V., and López, S. 1996. Trypsin Activation Pathway of Rotavirus Infectivity. *J. Virol.* **70**:5832-5839.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. F., Moore, D. D., Seldman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. Eds. 1992. *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N. Y.
- Bastardo, J. W., and I. H. Holmes. 1980. Attachment of SA11-Rotavirus to Erythrocyte Receptors. *Infect. Immun.* **29**:1134-1140.
- Baum, J. A., Geever, R., Giles, N. H. 1987. Expression of qa-1f Activator Protein: Identification of Upstream Binding Sites in the QA gene Cluster and Localization of DNA-Binding Domains. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 1256-1266.
- Bishop, R. F., Davidson, G. P., Holmes, I. H., and Ruck, B. J. 1973. Virus Particles in Epithelial Cells of Duodenal Mucosa From Children With Acute Nonbacterial Gastroenteritis. *Lancet* **2**:1281-1283.
- Boyle, J. F., and Holmes, K. V. 1986. RNA-Binding Proteins of Bovine Rotavirus. *J. Virol.* **58**:561-568.
- Bridger, J. C., and G. N. Woode. 1976. Characterization of Two Particle Types of Calf Rotavirus. *J. Gen. Virol.* **31**:245-250.
- Carbonell, L. F., Klowden, M. J., and Miller, L. K. 1985. Baculovirus-Mediated Expression of Bacterial Genes in Dipteran and Mammalian Cells. *J. Virol.* **56**:153-160.
- Coelingh, K. L.V. M., Murphy, B. R., Collins, P. L., Lebacqz-Vertheyden, A. M., and Battey, J. F. 1987. Expression of Biologically Active and Antigenically Authentic Parainfluenza Type 3 Virus Hemagglutinin-Neuraminidase Glycoprotein by a Recombinant Baculovirus. *Virol.* **160**:465-72.
- Crawford, S. E., M. Labbé, J. Cohen., M. H. Burroughs, Y.-J. Zhou, and M. K. Estes. 1994. Characterization of Virus-Like Particles Produced by the Expression of Rotavirus Capsid Proteins in Insect Cells. *J. Virol.* **68**:5945-5952.
- Crossen, R., and Gruenwald, S. 1996. *Baculovirus Expression Vector System Manual*. Instruction Manual. 3rd Edition. Pharmingen. San Diego, Ca. USA.
- Cuadras, R. M. A. 1998. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Biotecnología. Tesis Doctoral: Estudio del Mecanismo de Penetración de los Rotavirus a su Célula Huésped.
- Cuadras, M. A., Arias, C. F., and López, S. 1997. Rotaviruses Induce an Early Membrane Permeabilization of MA104 Cells and Do Not Require a Low Intracellular Ca<sup>2+</sup> Concentration To Initiate Their Replication Cycle. *J. Virol.* **71**:9065-9074.
- Desselberger U., McCrae M. A. In: Ramig R. F., ed. *The Rotavirus Genome*. Rotaviruses. Berlin: Springer-Verlag; 1994:31-66.
- Estes, M. K., D. Y. Graham, E. M. Smith., and C. P. Gerba. 1979. Rotavirus Stability and Inactivation. *J. Gen. Virol.* **43**:403-409.

- Estes, M. K., Palmer, E. L., and Obijeski, J. F. 1983. Rotaviruses: A Review. *Curr. Top. Microbiol.* **105**:123.
- Estes, M. K., and Cohen, J. 1989. Rotavirus Gene Structure and Function. *Microbiol. Rev.* **53**:410-449.
- Fiore, L., H. B. Greenberg., and E. R. Mackow. 1991. The VP8 Fragment of VP4 is The Rhesus Rotavirus Hemagglutinin. *Virology*. **181**:553-563.
- Flewett, T. H., Bryden, A. S., Davies, H., Woode, G. N., Bridger, J. C., and Derrick, J. M. 1974. Relation Between Viruses From Acute Gastroenteritis of Children and Newborns Calves. *Lancet* **ii**:61-63.
- Fuentes-Pananá, E. M., López, S., Gorziglia, M., and Arias, C. F. 1995. Mapping the Hemagglutination Domain of Rotaviruses. *J. Virol.* **69**:2629-2632.
- Fukudome, K., Yoshie, O., and Konno, T. 1989. Comparison of Human, Simian, and Bovine Rotavirus for Requirement of Sialic Acid and Hemagglutination and Cell Adsorption. *Virology*. **172**:196-205.
- Glass, R. I., Lew, J. F., Gangarosa, R. E., LeBaron, C. W., and Ho, M. S. 1991. Estimates of Morbidity and Mortality Rates for Diarrheal Diseases in American Children. *J. Pediatr.* **118**:27-33.
- Glass, R. I., J. R. Gentsch., and B. Ivanoff. 1996. New Lessons for Rotavirus Vaccines. *Science* **272**:46-48
- González, R. A., Torres-Vega, M. A., López, S., and Arias, C. F. 1998. In Vivo Interactions Among Rotavirus Nonstructural Proteins. *Arch. Virol.* **143**:981-996.
- Greenberg H. B., J. Flores, A. R. Kalica, R. G. Wyatt., and R. Jones. 1983. Gene Coding Assignments for Growth Restriction, Neutralization and Subgroup Specificities of the W and DS-1 Strains of Human Rotavirus. *J. Gen. Virol.* **64**:313-320.
- Horiuchi, T., Marumoto, Y., Saecki, Y., Sato, Y., Furusawa, M., *et al.* 1987. High-Level Expression of the Human  $\alpha$ -Interferon Gene Through the Use of an Improved Baculovirus Vector in the Silkworm, *Bombyx mori*. *Agric. Biol. Chem.* **51**:1573-1580.
- Hu, S., Kowoski, S. G., Schaaf, K. F. 1987. Expression of Envelope Glycoprotein of Human Immunodeficiency Virus by an Insect Virus Vector. *J. Virol.* **61**:3617-3620.
- Hua, J., Chen, X., and Patton, J. T. 1994. Deletion Mapping of the Rotavirus Metalloprotein NS53 (NSP1): The Conserved Cysteine-Rich Region is Essential for Virus-Specific RNA Binding. *J. Virol.* **68**:3990-4000.
- Imai, M., Akatani, K., Ikegami, N., and Furuichi, Y. 1983. Capped and Conserved Terminal Structures in Human Rotavirus Double-Stranded RNA Segments. *J. Virol.* **47**:125-136.
- Inumaru, S., Roy, P. 1987. Production and Characterization of the Neutralization Antigen VP2 of Bluetongue Virus Serotype 10 Using a Baculovirus Expression Vector. *Virology*. **157**:472-479.
- Isa, P., López, S., Segovia, L., and Arias, C. F. 1997. Functional and Structural Analysis of the Sialic Acid-Binding Domain of Rotaviruses. *J. Virol.* **71**:6749-6756.

- Jeang, K., Giam, C., Nerenberg, M., and Khoury, G. 1987. Abundant Synthesis of Functional Human T-Cell Leukemia Virus Type I p40<sup>x</sup> Protein in Eucaryotic Cells by Using a Baculovirus Expression Vector. *J. Virol.* **61**:708-713.
- Kalica, A. R., J. Flores., and Greenberg H. B. 1983. Identification of the Rotaviral Gene that Codes for Hemagglutination and Protease-Enhanced Plaque Formation. *Virol.* **125**:194-205.
- Kang, C. Y., Bishop, D. H. L., Seo, J. S., Matsuura, Y., and Cheo, M. H. 1988. Secretion of Human Hepatitis B Virus Surface Antigen From *Spodoptera frugiperda* Cells. *J. Gen. Virol.* **68**:2607-2613.
- Kapikian, A. Z., and R. M. Chanock. 1996. Rotaviruses, p. 1657-1708. *In* B. N. Fields (ed.), *Fields Virology*, vol. 2. Lippincott-Raven, Philadelphia, Pa.
- Kattoura, M. D., Clapp, L. L., and Patton, J. T. 1992. The Rotavirus Nonstructural Protein, NS35, Possesses RNA-Binding Activity *in vitro* and *in vivo*. *Virol.* **191**:698-708.
- Kuroda, K., Hauser, C., Rott, R., Klenk, H., and Doefler, W. 1986. Expression of the Influenza Virus Hemagglutinin in Insect Cells by a Baculovirus Vector. *EMBO J.* **5**:1359-1365.
- Labbé, M., Charpilienne, A., Crawford, S. E., Estes, M. K., and Cohen, J. 1991. Expression of Rotavirus VP2 Produces Empty Corelike Particles. *J. Virol.* **65**:2946-2952.
- Lawton, J. A., Estes, M. K., and Prasad, B. V. 1997. Three Dimensional Visualization of mRNA Release From Actively Transcribing Rotavirus Particles. *Nature Structural Biology.* **4**:118-121.
- Lizano, M., S. López, and Arias, C. F. 1991. The Amino-Terminal Half of Rotavirus SA114fM VP4 Protein Contains a Hemagglutination Domain and Primes for Neutralizing Antibodies To The Virus. *J. Virol.* **65**:1383-1391.
- López, S., C. F. Arias, J. R. Bell, J H. Strauss., and Espejo, R. T. 1985. Primary Structure of The Cleavage Site Associated With Trypsin Enhancement of Rotavirus SA11 Infectivity. *Virol.* **144**:11-19.
- Ludert, J. E., N. Feng, J. H. Yu, R. L. Broome, Y. Hoshino., and H. B. Greenberg. 1996. Genetic Mapping Indicates That VP4 Is The Rotavirus Cell Attachment Protein In Vitro and In Vivo. *J. Virol.* **70**:487-493.
- Madisen, L., Travis, B., Hu, S.-L., and Purchio, A. F. 1987. Expression of the Human Immunodeficiency Virus *gag* Gene in Insect Cells. *Virol.* **158**:248-250.
- Maeda, S., Kawai, T., Obinata, M., Chika, T., Horiuchi, T., *et al.* 1984. Characteristics of Human Interferon- $\alpha$  Produced by a Gene Transferred by a Baculovirus Vector in the Silkworm, *Bombyx mori*. *Proc. Jpn. Acad.* **60**:423-426.
- Maeda, S., Kawai, T., Obinata, M., Fujiwara, H., Horiuchi, T., *et al.* 1985. Production of Human  $\alpha$ -Interferon in Silkworm Using a Baculovirus Vector. *Nature.* **315**:592-594.
- Mattion, N. M., Cohen, J., Aponte, C., and Estes, M. K. 1992. Characterization of An Oligomerization Domain and RNA-Binding Properties on Rotavirus Nonstructural Protein NS34. *Virol.* **190**:68-83.
- McCrae, M. A., and McCorquodale, J. G. 1983. Molecular Biology of Rotaviruses. Terminal Structure of Viral RNA Species. *Virol.* **126**:204-212.



- Méndez, E., Arias, C. F., and López, S. 1993. Binding of Sialic Acids is Not An Essential Step for the Entry of Animal Rotaviruses to Epithelial Cells in Culture. *J. Virol.* **67**:5253-5259.
- Méndez, E., Arias, C. F., and López, S. 1996. Interactions Between the Two Surface Proteins of Rotavirus May Alter the Receptor-Binding Specificity of the Virus. *J. Virol.* **70**:1218-1222.
- Miller, L. K. 1988. Baculoviruses as Gene Expression Vectors. *Ann. Rev. Microbiol.* **42**:177-199.
- Miyajima, A., Schreurs, J., Otsu, K., Kondo, A., Arai, K., and Maeda, S. 1987. Use of the Silworm, *Bombyx mori*, and an Insect Baculovirus Vector of High-Level Expression and Secretion of Biologically Active Mouse Interleukin-3. *Gene.* **58**:273-281.
- Miyamoto, C., Smith, G. E., Farrel-Towt, J., Chizzonite, R., Summers, M. D., and Ju, G. 1985. Production of Human *c-myc* Protein in Insect Cells Infected With a Baculovirus Expression Vector. *Mol. Cell. Biol.* **5**:2860-2865.
- Oldfield, S., Adachi, A., Urakawa, T., Hirasawa, T., and Roy, P. 1990. Purification and Characterization of the Major Group-Specific Core Antigen VP7 of Bluetongue Virus Synthesized by a Recombinant Baculovirus. *J. Gen. Virol.* **71**:2649-2656.
- Ollo, R., Maniatis, T. 1987. *Drosophila* Kruppel Gene Product in a Baculovirus Expression System is a Nuclear Phosphoprotein That Binds to DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**:5700-5704.
- Otero, M. J. and Carrasco, L. 1987. Proteins are Cointernalized with Virion Particles During Early Infection. *Virol.* **160**:75-80.
- Pastey, M. K., and Samal, S. K. 1998. Baculovirus Expression of the Fusion Protein Gene of Bovine Respiratory Syncytial Virus and Utility of the Recombinant Protein in a Diagnostic Enzyme Immunoassay. *J. Clin. Microb.* **36**:1105-1108.
- Patton, J. T. 1986. Synthesis of Simian Rotavirus SA11 Double-Stranded RNA In a Cell-Free System. *Virus Res.* **6**:217-233.
- Patton, J. T., and Gallegos, C. O. 1988. Structure and Protein Composition of the Rotavirus Replicase Particle. *Virol.* **166**:358-365.
- Patton, J. T., and Gallegos, C. O. 1990. Rotavirus RNA Replication: Single-Stranded RNA Extends from the Replicase Particle. *J. Gen. Virol.* **71**:1087.
- Patton, J. T. 1995. Structure and Function of the Rotavirus RNA-Binding Proteins. *J. Gen. Virol.* **76**:2633-2644.
- Patton, J. T., Wentz, M., Xiaobo, J., and Ramig, F. 1996. *cis*-Acting Signals That Promote Genome Replication in Rotavirus mRNA. *J. Virol.* **70**:3961-3971.
- Patton, J. T., Jones, M. T., Kalbach, A. N., He, Y-W., and Xiaobo, J. 1997. Rotavirus RNA Polymerase Requires the Core Shell Protein To Synthesize the Double-Stranded RNA Genome. *J. Virol.* **71**:9618-9626.
- Pennock, G. D., Shoemaker, C., and Miller, L. K. 1984. Strong and Regulated Expression of *Escherichia coli*  $\beta$ -Galactosidase in Insect Cells With a Baculovirus Vector. *Mol. Cell. Biol.* **4**:399-406.

- Poncet, D., Aponte, C., and Cohen, J. 1993. Rotavirus Protein NSP3 (NS34) Is Bound to the 3' End Consensus Sequence of Viral mRNAs Infected Cells. *J. Virol.* **67**:3159-3165.
- Possee, R. D. 1986. Cell-Surface Expression of Influenza Virus Hemagglutinin in Insect Cells Using a Baculovirus Vector. *Virus Res.* **5**:43-59.
- Prasad, B. V., Rothnagel, R., Zeng, C. Q.-Y., Jakana, J., Lawton, J. A., Chiu, W., and Estes, M. K. 1996. Visualization of Ordered Genomic RNA and Localization of Transcriptional Complexes in Rotavirus. *Nature* **382**:471-473.
- Redmond, M. J., Ijaz, M. K., Parker, M. D., Sabara, M. I., Dent, D., and Babiuk, L. A. 1993. Assembly of Recombinant Rotavirus Proteins into Virus-Like Particles and Assessment of Vaccine Potential. *Vaccine.* **11**:278-281.
- Rice, W. C., Lorimer, H. E., Prives, C., Miller, L. K. 1987. Expression of Polyomavirus Large T Antigen by Using a Baculovirus Vector. *J. Virol.* **61**:1712-1716.
- Ruggeri, F. M., and H. B. Greenberg. 1991. Antibodies to the Trypsin Cleavage Peptide VP8 Neutralize Rotavirus by Inhibiting Binding of Virions to Target Cells in Culture. *J. Virol.* **65**:2211-2219.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* 2nd Edition.
- Sandino, A. M., M. Jashes, G. Faundez., and E. Spencer. 1986. Role of the Inner Protein Capsid on In Vitro Human Rotavirus Transcription. *J. Virol.* **60**:797-802.
- Shaw, A. L., R. Rothnagel, D. Chen, R. F. Ramig, W. Chiu., and Prasad B. V. 1993. Three-dimensional Visualization of the Rotavirus Hemagglutinin Structure. *Cell* **74**:693-701.
- Smith, G. E., Ju, G., Ericson, B. L., Moschera, J., Lahm, H.-W., *et al.* 1985. Modification and Secretion of Human Interleukin 2 Produced in Insect Cells by a Baculovirus Expression Vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**:8404-8408.
- Smith, G. E. Summers, M. D., Fraser, M. J. 1983. Production of Human Beta Interferon in Insect Cells Infected With a Baculovirus Expression Vector. *Mol. Cell. Biol.* **3**:183-192.
- St. Angelo, C. S., Smith, G. E., Summers, M. D., Krug, R. M. 1987. Two of the Three Influenza Viral Polymerase (P) Proteins Expressed Using Baculovirus Vectors Form a Complex in Insect Cells. *J. Virol.* **61**:361-365.
- Summer, M. D., and G. E. Smith. 1987. *A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cells Culture Procedures.* Texas Agricultural Experiment Station Bulletin no. 1555. Texas A & M University, College Station.
- Takehara, K., Ireland, D., and L. Bishop, D. H. 1988. Co-expression of the Hepatitis B Surface and Core Antigens Using Baculovirus Multiple Expression Vectors. *J. Gen. Virol.* **69**:2763-2777.
- Urakawa, T., Ferguson, M., Minor, P. D., Cooper, J., Sullivan, M., Almond, J. W., and L. Bishop, D. H. 1989. Synthesis of Immunogenic, but Non-Infectious, Poliovirus Particles in Insect Cells by a Baculovirus Expression Vector. *J. Gen. Virol.* **70**:1453-1463.

- Walsh, J. A., and Warren, K. S. 1979. Selective Primary Health Care: An Interim Strategy for Disease Control in Developing Nations. *N. Engl. J. Med.* **301**:967-974.
- Wentz, M. J., Patton, J. T., and Ramig, R. F. 1996. The 3'-Terminal Consensus Sequence of Rotavirus mRNA is The Minimal Promoter of Negative-Strand RNA Synthesis. *J. Virol.* **70**:7833-7841.
- Wentz, M. J., Zeng, C. Q.-Y., Patton, J. T., Estes, M. K., and Ramig, R. F. 1996. Identification of the Minimal Replicase and the Minimal Promoter of (-)-Strand Synthesis, Functional in Rotavirus RNA Replication *In Vitro* . In *Viral Gastroenteritis*, pp. 59-67. Edited by S. Chiba, M. K. Estes, S. Nakata and C.H. Calisher. Viena: Springer-Verlag.
- Yeager, Mark., Berriman, J. A., Baker, T. S., and Bellamy, A. R. 1994. Three-Dimensional Structure of the Rotavirus Haemagglutinin VP4 by Cryo-Electron Microscopy and Difference Map Analysis. *The EMBO Journal.* **13**:1011-1018.
- Yolken, R. H., Willoughby, R., Wee, S. B., Miskuff, R., and Vonderfeth S. 1987. Sialic Acid Glycoproteins Inhibit *In Vitro* and *In Vivo* Replication of Rotaviruses. *J. Clin. Invest.* **79**:148-154.
- Zeng, C. Q.-Y., Labbé, M., Cohen, J., Prasad, B. V., Chen, D., Ramig, R. F., and Estes, M. K. 1994. Characterization of Rotavirus VP2 Particles. *Virol.* **201**:55-65.
- Zeng, C. Q.-Y., Wentz, M. J., Cohen, J., Estes, M. K., and Ramig, R. F. 1996. Characterization and Replicase Activity of Double-Layered and Single-Layered Rotavirus-Like Particles Expressed from Baculovirus Recombinants. *J. Virol.* **70**:2736-2742.
- Zeng, C. Q.-Y., Estes, M. K., Charpilienne, A., and Cohen, J. 1998. The N Terminus of Rotavirus VP2 Is Necessary for Encapsidation of VP1 and VP3. *J. Virol.* **72**:201-208.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA