



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MÉXICO**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**DISEÑO DE ESTRATEGIAS DE PRODUCCIÓN DE
PARTÍCULAS PSEDOVIRALES DE ROTAVIRUS
BOVINO EN LEVADURAS MEDIANTE HERRAMIENTAS
MOLECULARES Y DE BIOPROCESO**

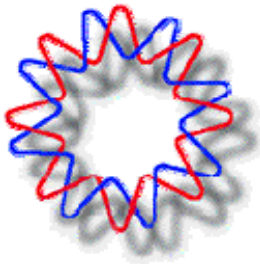
T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

P R E S E N T A

M. en C. WILLIAM ALFONSO RODRÍGUEZ LIMAS

DIRECTORA DE TESIS: Dra. Laura A. Palomares A.



CUERNAVACA, MORELOS

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría de la Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera en el laboratorio del Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich. Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico a través de los proyectos IN206407 e IN224409, CONACyT Fondo Salud 69911 y CONACyT Ciencia Básica 101847.

Este trabajo está dedicado a mis padres, hermanos y sobrinos,
que siempre me apoyan desde la distancia,
y a Diego por todo su amor y comprensión.

When you make the finding yourself - even if you're the last person on Earth to see the light - you'll never forget it.

Carl Sagan

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Laura Palomares Aguilera por su asesoría durante todo el desarrollo del presente trabajo, por su apoyo incondicional y por su capacidad para tomar lo bueno de cada individuo y potenciarlo.

Al Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez por su apoyo permanente, por permitirme formar parte de su grupo de investigación y por su ejemplo como investigador.

A los miembros de mi comité tutorial por su guía durante el desarrollo del presente proyecto:

Dr. Carlos Federico Arias

Dr. Jorge Luis Folch Mallol

A los miembros del jurado por su tiempo, dedicación y sugerencias:

Dr. Agustín López Munguía Canales

Dr. Carlos Felipe Peña Malacara

Dra. Angélica Meneses Acosta

Dr. Fernando Esquivel Guadarrama

Dr. Luis Padilla Noriega

A Karin Levy, M. en C. Vanesa Hernández, M en C. Ana Ruth Pastor, M en C. Martha Alicia Contreras y Ana Yuridia Ocampo por el apoyo técnico y logístico.

A los doctores Jens Nielsen y Keith Tyo por permitirme formar parte de su excelente grupo de trabajo en la Universidad Tecnológica de Chalmers, en Suecia, por sus enseñanzas y por el apoyo durante mi estancia de investigación en el grupo Sysbio.

A los miembros de los grupos OTR y EG por su ayuda constante durante el desarrollo del presente trabajo.

Al personal de planta piloto, microscopía electrónica, unidad de secuenciación y demás áreas de apoyo del instituto que permitieron que este trabajo se llevara a cabo de la mejor forma.

Al personal de docencia del IBt, Toño, Gloria y Jalil por siempre estar dispuestos a ayudarme.

Al M en C. Diego Cuevas y a toda su familia por el apoyo, paciencia, amistad y cariño brindados durante todos estos años.

A mis amigos, Maudacio, Toño, Vane, la Chikis, el pato, Lilí, Ori, Georghe, Itzcoatl, Perla, Pepe, la Chío, Ale y toda esa gente que hizo que mi vida en México fuera de lo mejor.

ÍNDICE

INDICE.....	vii
Índice de figuras.....	x
Índice de tablas.....	xii
Nomenclatura.....	xiii
CAPÍTULO 1. RESUMEN	15
CAPÍTULO 2. INTRODUCCIÓN	19
CAPÍTULO 3. ANTECEDENTES	21
3.1 Rotavirus.....	22
3.2 Las partículas pseudovirales (PPV).....	23
3.3 PPV en vacunación.....	24
3.4 PPV de rotavirus bovino.....	25
3.5 Protección generada por las vacunas comerciales	26
3.6 Producción de PPV a partir de levaduras	27
3.7 Manipulación genética en levaduras.....	27
3.8 Metabolismo de crecimiento y energía en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29
CAPÍTULO 4. JUSTIFICACIÓN.....	31
CAPÍTULO 5. HIPOTESIS Y OBJETIVOS	32
5.1 Hipótesis	32
5.2 Objetivo general	32
5.3 Objetivos específicos	32
CAPÍTULO 6. MATERIALES Y MÉTODOS	33
6.1. Amplificación de genes de rotavirus bovino.....	33
6.1.1. <i>Genes de VP2 y ΔVP2</i>	33
6.1.2. <i>Gen de VP6 (cepa NCDV)</i>	35
6.1.3. <i>Genes de VP7 (genotipos G10 y G6)</i>	36
6.2. Subclonación en vectores para levaduras	36

6.3. Transformación de levaduras.....	39
6.4. Medio de cultivo	39
6.5. Cultivos en matraz	41
6.6. Cultivos en fermentador	41
6.7. Métodos analíticos	42
6.8. Extracción de proteína intracelular	42
6.9. Detección de proteínas de rotavirus	42
6.9.1 Inmunofluorescencia para levaduras	43
6.10 Purificación de PPV de rotavirus.....	44
6.11. Ensayos <i>in vivo</i>	45
6.11.1 Detección de anticuerpos IgG ó IgA anti VP6 en suero de ratones.....	45
6.11.2 Detección de anticuerpos IgA anti VP6 en muestras de heces fecales de ratones.....	46
6.11.3 Reto con Rotavirus murino cepa EDIM.....	46
6.11.4 Detección de rotavirus cepa EDIM por ELISA en heces de ratones.....	47
CAPÍTULO 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
7.1. Amplificación de genes de rotavirus bovino.....	48
7.1.1. Gen de VP2	48
7.1.2. Gen de VP6.....	49
7.1.3. Genes de VP7	49
7.2. Clonación en vectores para levaduras.....	50
7.2.1. Vectores de la familia pRS y pSAL	50
VP2 en pRS2	50
VP6 en pRS7	50
VP7 en pSAL4 y pSAL5.....	51
7.2.2. Construcciones en el vector pSP-GM2	52
pWR12	52
pWR6.....	53
pWR7.....	54
pWR26.....	54
pWR267	55
7.3. Expresión de proteínas heterólogas	56
7.4. Diseño de experimentos para suplementación del medio de cultivo CSM	57

7.4.1. Diseño experimental 2 ⁴ ¹	58
7.4.2. Diseño experimental 2 ³ para la cepa PJ.T-6	59
7.5. Análisis transcriptómico de cepas de <i>S. cerevisiae</i> productoras de VP6	61
7.6 . Estrategias moleculares para la producción simultanea de las tres proteínas de rotavirus (VP2, VP6 y VP7).....	61
7.6.1 Selección de plásmidos y cepas	61
7.6.2 Cultivos por lote alimentado	65
7.7. Extracción de proteína intracelular y purificación primaria.....	68
7.8. Microscopía electrónica	71
7.9. Evaluación de la capacidad inmunogénica.....	72
7.9.1 Límites mínimos de proteína heteróloga.....	72
7.9.2 Ensayos con una y dos dosis de antígeno.....	73
CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES	77
CAPÍTULO 9. PERSPECTIVAS.....	79
CAPÍTULO 10. PRODUCTOS GENERADOS	81
10.1 Artículos arbitrados	81
10.2 Solicitud de patente	81
10.3 Presentaciones en congresos nacionales e internacionales	81
10.4 Artículo <i>in extenso</i>	83
10.5 Premios y distinciones	83
REFERENCIAS	84
ANEXOS.....	90
ANEXO A. Datos de las cinéticas del diseño experimental 2³.....	91
ANEXO B.1 Datos de biomasa y metabolitos de los cultivos por lote	92
ANEXO B.2 Datos de biomasa y metabolitos de los cultivos por lote alimentado ...	94
ANEXO C Análisis transcriptómico de cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> productoras de VP6.....	96
ANEXO D Artículo <i>Microbial Cell Factories</i> (2011).....	107
ANEXO E Artículo <i>Vaccine</i> (2009).....	118
ANEXO F Artículo <i>in extenso</i> 1st ICBB ISBN 978.607.95065.1.3.....	123

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1 Esquema estructural del rotavirus	22
Figura 3.2 Principales componentes de la ruta metabólica energética de <i>S. cerevisiae</i>	29
Figura 6.1. Plásmidos de la familia pSP-GM2	37
Figura 7.1 RNA total extraído de cultivos de células H5 infectados con BacVP2	48
Figura 7.2 Reacciones de PCR de gradiente para VP2	48
Figura 7.3 Reacción de PCR para VP6	49
Figura 7.4 PCR de colonias para las construcciones pCR2.1 + VP7	49
Figura 7.5 PCR de colonias de 20 clonas obtenidas de la ligación PRS2 VP2.....	50
Figura 7.6 Amplificación por PCR de colonias del gen de VP6 insertado en el vector pRS7	51
Figura 7.7. PCR de colonias de diferentes construcciones de VP7 realizadas en <i>E. coli</i>	51
Figura 7.8 Patrón de restricción de 4 clonas de VP7 con EcoRI	52
Figura 7.9. PCR de colonias para verificación de la construcción pWR Δ 2.....	53
Figura 7.10. Verificación del plásmido pWR6.....	53
Figura 7.11. Verificación del plásmido pWR7.....	54
Figura 7.12. Verificación del plásmido pWR26.....	55
Figura 7.13 Verificación del plásmido pWR267	55
Figura 7.14 Inmunodetección de proteínas de rotavirus en cultivos de <i>S.c</i> W3031a que expresan individualmente VP2, VP6 ó VP7.....	56
Figura 7.15 Western blot de cinética de cultivo de la cepa PJ.T-6	57
Figura 7.16 VP6 determinada por ELISA y Western blot de extractos celulares de los experimentos 1 a 8.....	59
Figura 7.17 Concentración de VP6 determinada por ELISA para extractos celulares del diseño experimental 2 ³	60
Figura 7.18. Cultivos por lote de cepas de <i>S. cerevisiae</i> productoras de VP6 en medio CSM	64

Figura 7.19. Cultivos por lote alimentado de cepas de <i>S. cerevisiae</i> productoras de VP6 ó VP2, VP6 y VP7, crecidos en medio CSM.....	66
Figura 7.20. Formación de producto y productividades en cultivos por lote alimentado de cepas de <i>S. cerevisiae</i>	67
Figura 7.21. Diagrama de flujo de los pasos de purificación primaria para proteína intracelular de <i>S. cerevisiae</i> PD.U-267	69
Figura 7.22 <i>Slot blot</i> para proteínas de rotavirus en diferentes etapas de purificación	69
Figura 7.23. Análisis de PPV de rotavirus obtenidas por gradientes de CsCl	70
Figura 7.24. Media geométrica de los títulos de IgG´s específicos anti VP6 de rotavirus en suero de ratones	72
Figura 7.25. Media geométrica de los títulos de IgG´s específicos anti VP6 de rotavirus en suero de ratones para diferentes antígenos y dosis	73
Figura 7.26. Análisis de ELISA de suero diluido (1:5) que muestra la presencia de IgG´s anti VP6 de rotavirus en los grupos de ratones del estudio.....	74
Figura 7.27. Análisis de ELISA de heces diluidas (5% P/V) que muestra la replicación viral de rotavirus de la cepa EDIM en animales vacunados	75
Figura C.1. Cinética de producción de biomasa en el que se esquematiza el tiempo de muestreo para los microarreglos.....	97
Figura C.2.A. Cinética de crecimiento para las 4 cepas del análisis de transcriptoma	98
Figura C.2.B. Valores de μ_{max} para cada cepa	98
Figura C.3.A. Cinética de producción de VP6 para las cepas de <i>S. cerevisiae</i> PD.U-6 y CEN.U-6, en cultivos por lote	98
Figura C.3.B. Rendimiento específico biomasa producto a lo largo de los cultivos	98
Figura C.4. Esquema de la normalización de datos de los doce microarreglos	99
Figura C.5. Clustering de datos	101
Figura C.6.A. Representación esquemática de la organización funcional de Met4	102
Figura C.6.B. Modalidades de reclutamiento de DNA, dependiendo del tipo de gen MET a regular	102
Figura C.7. Diagrama de Venn	103
Figura C.8. Análisis de ontología de genes para 610 genes cambiantes en las cepas productoras de VP6.....	104
Figura. C.9. Análisis de ontología de genes para los genes cambiantes en las cepas control.....	105

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1	Proteínas estructurales de rotavirus.....	23
Tabla 6.1	Oligonucleótidos para amplificación de VP2 y EGFP-VP2	33
Tabla 6.2	Condiciones de PCR para el gen de VP2	34
Tabla 6.3	Oligonucleótidos para amplificación de Δ VP2	34
Tabla 6.4	Oligonucleótidos para amplificación de VP6 cepa NCDV	35
Tabla 6.5	Condiciones de PCR para el gen de VP6	35
Tabla 6.6	Oligonucleótidos para amplificación del <i>cassette</i> TEF1-VP7-CYC1 term.....	36
Tabla 6.7	Plásmidos construidos en el presente estudio	38
Tabla 6.8	Oligonucleótidos para verificación de construcciones.....	38
Tabla 6.9	Construcciones realizadas en este estudio.....	40
Tabla 7.1	Condiciones del diseño experimental 2^{4-1}	58
Tabla 7.2.	Diseño experimental de tres variables a dos niveles	59
Tabla 7.3.	Parámetros cinéticos y estequiométricos del diseño experimental 2^3	60
Tabla 7.4.	Parámetros cinéticos y estequiométricos de las cepas con uno (W.T-6) o tres plásmidos (W.TLU-C) en la misma célula.....	62
Tabla 7.5.	Parámetros cinéticos y estequiométricos de cultivos por lote de cepas productoras de VP6	63
Tabla C.1.	Valores de FC para los ensayos entre la cepa PD.U-6 y PD.U-C.....	100

NOMENCLATURA

μ_{\max}	Velocidad específica máxima de crecimiento (h^{-1})
ADH1	Promotor de alcohol deshidrogenasa 1
b	Constante de alimentación (0.19 h^{-1})
C_s^f	Concentración de sustrato en la alimentación (g glucosa/L)
C_s	Concentración de sustrato al tiempo t (g glucosa/L)
CSM	Medio sintético completo
CTR	Velocidad de transferencia de dióxido de carbono (mM/h)
CUP1	Promotor del gen de metalotioneína 1
DCW	Biomasa en peso seco (g)
DLP	Partícula pseudoviral de doble capa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO_{600}	Densidad óptica medida a 600 nm
dsRNA	Ácido ribonucleico de doble cadena
F	Velocidad de alimentación (mL/h)
FDA	Agencia de Drogas y Alimentos en Estados Unidos
GMT	Media geométrica de los títulos de anticuerpo
GO	Ontología de genes
GRAS	Generalmente reconocido como seguro
MW	Marcador de peso molecular
pb	Pares de bases
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos

PCA	Análisis de componentes principales
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFU	Unidades formadoras de placa
PGK1	Promotor de fosfogliceraldehido cinasa 1
PMA1	Promotor de ATPasa de membrana plasmática 1
PPV	Partículas pseudovirales
RBS	Sitio de unión a ribosoma
RE	Retículo endoplasmático
RNA _T	Ácido ribonucleico total
SCI-BV	Sistema células de insecto - baculovirus
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
TCA	Ciclo de ácidos tricarboxílicos
T _D	Tiempo de duplicación (h)
TEF1	Promotor del factor de elongación de la transcripción 1
tIRLP	Partículas pseudovirales de rotavirus de triple capa
TOD	Tensión de oxígeno disuelto (%)
V ₀	Volumen inicial en etapa por lote (L)
VPH	Virus del papiloma humano
vvm	Volumen de gas por volumen de líquido por minuto (L/min)
x ₀	Biomasa inicial al final de la etapa por lote (gDCW/L)
YCp	Plásmido centromérico
YEp	Plásmido episomal
YIp	Plásmido integrativo
Y _{P/S}	Rendimiento producto/sustrato (g producto/g glucosa)
Y _{P/X}	Rendimiento producto/biomasa (g producto/g DCW)
Y _{S/X}	Rendimiento sustrato/biomasa (g glucosa/g DCW)

CAPÍTULO 1

RESUMEN

Las estrategias del productor ganadero para contender contra la enfermedad diarreica neonatal bovina son principalmente la profilaxis mediante la vacunación de las vacas gestantes, semanas antes del nacimiento de los becerros. El presente trabajo explora la posibilidad de producir antígenos basados en las proteínas de rotavirus bovino, que sean capaces de generar protección pasiva a las crías y que puedan servir como vacunas más eficientes y seguras para las madres gestantes.

La producción de partículas pseudovirales (PPV) en *Saccharomyces cerevisiae* es una plataforma atractiva, ya que es un sistema productor de bajo costo que es capaz de ensamblar proteínas virales y formar PPV. Sin embargo, hasta la fecha, sólo se han conseguido producir PPV de una sola capa. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue utilizar herramientas de tipo molecular y de bioproceso para obtener partículas pseudovirales de rotavirus que fueran utilizadas como antígenos en la formulación de una vacuna de tipo veterinario.

Para ello, los genes de las proteínas estructurales de rotavirus VP2, VP6 y VP7 fueron clonados en cuatro cepas de *Saccharomyces cerevisiae* usando diferentes combinaciones de plásmidos y promotores para expresar una, dos o tres proteínas de rotavirus en la misma célula. Se evaluó el desempeño de las mejores construcciones en cultivos por lote y por lote alimentado usando el medio CSM suplementado con leucina, glutamato y succinato en concentraciones que fueron optimizadas mediante diseño de experimentos. El tipo de cepa utilizada tuvo un efecto importante en la concentración de proteína recombinante, mientras que el tipo de plásmido utilizado (centromérico o episomal), no afectó los rendimientos de proteína. Los cultivos por lote alimentado de la cepa PD.U-267 tuvieron los valores más altos de proteínas heterólogas ya que las productividades volumétrica y específica se incrementaron 28.5 y 11 veces, respectivamente, en comparación con los cultivos por lote. La expresión de las tres proteínas fue confirmada por *immunoblotting* y las partículas pseudovirales de rotavirus fueron detectadas por

microscopía electrónica de transmisión. Los extractos de levadura obtenidos por ruptura y centrifugación, que contenían las proteínas VP2, VP6 y VP7 y PPV de rotavirus, fueron utilizados para inmunizar ratones adultos y evidenciar la generación de anticuerpos y la protección de la vacuna ante el reto de los animales con un rotavirus murino de la cepa EDIM. Los resultados mostraron que dos dosis de extracto de levadura que contenía 3 µg de VP6 y cantidades no cuantificadas de VP2 y VP7 eran suficientes para proveer protección total contra la infección por rotavirus murino.

Este trabajo presenta por primera vez el uso de levaduras como plataforma de expresión para la producción de partículas pseudovirales de rotavirus. El presente estudio muestra que el uso combinado de estrategias moleculares y de bioproceso, permite la producción de PPV de triple capa, aunque a bajas concentraciones. Las proteínas heterólogas y PPV obtenidas en este sistema protegieron a ratones adultos de la infección por rotavirus murino, mostrando una protección heterotípica importante, aunque aun es necesario ahondar en el ensamblaje de partículas de triple capa y su influencia sobre la respuesta inmune en nuestro modelo vacunal. Finalmente, Este trabajo abre la puerta al desarrollo de vacunas de mejor cobertura, desarrollando procesos de producción capaces de ser implementados por la industria farmacéutica veterinaria nacional.

ABSTRACT

The strategies used by livestock producers to fight against neonatal diarrhea are mainly based on prophylaxis, by vaccination of pregnant cows some weeks before calving. This thesis explores the production of bovine rotavirus proteins as a new vaccine candidate. These antigens will be capable to induce passive protection to young animals and increase the efficiency and safety of vaccines when they are used in pregnant animals.

Virus-like particle (VLP) production in *Saccharomyces cerevisiae* is an attractive platform, as this yeast is a low-cost producer with the intracellular environment required to assemble viral proteins into VLP. However, to date yeasts have only been used to produce simple VLP, formed by a single protein layer. The aim of this study was to use molecular and bioprocess tools to obtain multilayered rotavirus-like particles (RLP) and use these antigens in a veterinary vaccine formulation.

The genes of the rotavirus structural proteins VP2, VP6 and VP7 were cloned in four *Saccharomyces cerevisiae* strains using different plasmid and promoter combinations to express one, two or three proteins in the same cell. Performance of the best constructs was evaluated in batch and fed-batch cultures using a complete synthetic media supplemented with leucine, glutamate and succinate. The strain used had an important effect on recombinant protein concentration, while the type of plasmid, centromeric (YCp) or episomal (YEp), did not affect protein yields. Fed-batch culture of the PD.U-267 strain resulted in the highest concentration of rotavirus proteins. Volumetric and specific productivities increased 28.5- and 11-fold, respectively, in comparison with batch cultures. Expression of the three rotavirus proteins was confirmed by immunoblotting and RLP were detected using transmission electron microscopy. Yeast extracts contained the rotavirus proteins VP2, VP6 and VP7 and RLP. These extracts were used to immunize adult mice and they induced antibody production and protection against challenge with the EDIM strain of murine rotavirus. The results show that two doses of yeast extract containing 3 µg

of VP6 and non quantified amounts of VP2 and VP7 were sufficient to provide total protection against murine rotavirus infection.

We present for the first time the use of yeast as a platform to express multilayered rotavirus-like particles. The present study shows that the combined use of molecular and bioprocess tools allows the production of triple-layered RLP, even at low concentrations. Heterologous proteins and VLP obtained in this platform protected adult mice against murine rotavirus infection, showing a significant heterotypic protection. This work opens the door to the development of vaccines with a better coverage. The developed production process can be easily implemented by the local veterinary pharmaceutical industry, providing an efficient tool for the fast and safe production of bovine rotavirus vaccines relevant for Mexico.

CAPÍTULO 2

INTRODUCCIÓN

La infección por rotavirus es considerada la principal causa de diarrea neonatal bovina en el mundo [1]. El rotavirus afecta a los becerros en las primeras cuatro semanas de vida, ocasionando importantes pérdidas económicas por mortalidad o morbilidad de los animales afectados. La elevada incidencia de la enfermedad –que puede ser superior al 60%- implica altos costos en tratamientos veterinarios, tiempo y mano de obra, que se suman a las pérdidas económicas asociadas a las muertes de los animales o al retraso en el desarrollo corporal de los individuos que sobreviven a la infección [2].

Las vacunas para prevención de rotavirus en bovinos, porcinos y equinos han estado disponibles en el mercado desde hace muchos años. La prevención de la enfermedad en estos animales se basa en una administración parenteral de la vacuna con virus atenuados o inactivados a las madres gestantes, a fin de proveer una inmunización pasiva a las crías a través del calostro o leche en los primeros días de nacidas [1]. En bovinos, las vacas gestantes se vacunan entre la sexta y novena semana antes del parto, aplicando un refuerzo entre la tercera y sexta semana antes del nacimiento de los becerros. Aunque algunos autores describen protección heterotípica, estudios previos de nuestro grupo de investigación encontraron que animales inmunizados con una vacuna comercial que contiene una cepa de rotavirus bovino inactivado del genotipo G6, P[1], desarrollaban la enfermedad si habían sido expuestos a cepas de rotavirus del genotipo G10, P[11] y algunos de estos animales murieron a causa de las complicaciones de la infección [3]. Estos resultados están acordes con reportes del sistema de vigilancia epidemiológica del departamento de agricultura de Estados Unidos, quienes alertan sobre la limitada protección cruzada entre genotipos de rotavirus [4]. Por esta razón, se requieren vacunas que contengan los genotipos bovinos necesarios para proveer una protección homotípica y/o heterotípica suficiente para impedir la infección causada por las

cepas circulantes. Estas vacunas deben ser altamente seguras para evitar el desarrollo de la enfermedad diarreica en las vacas gestantes.

Nuevas aproximaciones para el desarrollo de vacunas contra rotavirus bovino han evaluado proteínas de VP6 producidas en *E. coli* y partículas pseudovirales (PPV) como antígenos, mostrando altos niveles de protección en animales modelo [5-9]. Estas PPV están formadas por proteínas estructurales de rotavirus que tienen la capacidad de autoensamblarse al ser expresadas en sistemas heterólogos. Se caracterizan porque tienen una estructura casi idéntica a la de los virus nativos, pero carecen de material genético, lo cual hace que no sean infectivas. Dichas partículas han sido producidas con éxito en el sistema células de insecto-baculovirus (SCI-BV), aunque los costos asociados al proceso de producción y purificación hacen poco rentable la comercialización como vacunas veterinarias. Por dicha razón, se buscan plataformas de producción alternativas que permitan la obtención de PPV de rotavirus a una mayor escala con menores costos de producción.

El presente trabajo evalúa el uso de levaduras como plataforma de expresión para las PPV de rotavirus. En general, las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* y *Pichia pastoris* han sido utilizadas para producir PPV de capa sencilla. Estas PPV están compuestas por una sola proteína o proteínas quiméricas ensambladas en una sola capa [5], pero no hasta la fecha no existen PPV de múltiples capas expresadas en levaduras, con lo cual se plantea un reto metodológico y tecnológico para la producción de PPV de rotavirus en eucariotes inferiores.

CAPÍTULO 3

ANTECEDENTES

El término vacunación fue acuñado hacia finales del siglo XVIII por el médico Británico Edward Jenner, quien usó el virus de la viruela vacuna para inmunizar niños y adultos contra el virus de la viruela humana. A partir de allí, durante más de dos siglos se han desarrollado vacunas contra una gran variedad de agentes infecciosos que se atenúan o inactivan para su uso en medicina veterinaria y humana. Sin embargo, los sistemas tradicionales de producción de vacunas son frecuentemente ineficientes e inseguros, ya que pueden contener contaminantes patógenos, o presentar reversión de la atenuación o una ineficiente inactivación de los virus, lo que desencadena brotes de la enfermedad para la cual fueron diseñados [5].

A lo largo de los siglos XIX y XX, la mayoría de las vacunas fueron desarrolladas exclusivamente para estimular el sistema inmune y producir anticuerpos. En años recientes, los avances en inmunología han brindado un conocimiento más profundo de la inmunidad mediada por células y gracias a las técnicas de biología molecular implementadas en los últimos 30 años, ahora es posible la aplicación de nuevas estrategias para el desarrollo de nuevas vacunas [6]. De esta manera, se han diseñado entre otras, las vacunas basadas en subunidades del agente infeccioso y las partículas pseudovirales (PPV), que tienen, entre otras ventajas la seguridad, ya que al no contener el patógeno completo, no se replican. Para el caso de las vacunas basadas en subunidades, se ha observado que algunas de ellas pueden conferir una escasa inmunidad debido al mal plegamiento de la proteína blanco o a una presentación ineficiente al sistema inmune [5]. Por otra parte, las vacunas que contienen partículas pseudovirales (PPV) pueden ser reconocidas más eficientemente por el sistema inmune y han sido utilizadas con éxito en la formulación de vacunas comerciales. En el presente capítulo se abordarán en detalle los conceptos del rotavirus y avances en la producción de las PPV para el área de vacunación.

3.1 Rotavirus

El rotavirus pertenece a la familia *Reoviridae* y posee 11 segmentos de RNA de doble cadena (dsRNA). Presenta proteínas distribuidas en tres capas concéntricas siguiendo una simetría icosaédrica (Fig. 3.1). La nucleocápside está conformada por la proteína estructural VP2, en cuyo interior se encuentran las proteínas VP1 y VP3 unidas al dsRNA. La nucleocápside se forma por la interacción de 120 moléculas de VP2, formando una estructura de 50 nm de diámetro. Se ha observado que al expresar VP2 de forma recombinante en células de insecto, ésta puede autoensamblarse formando la nucleocápside. VP2 se organiza en dímeros, los cuales interactúan para formar un decámero y doce de estos decámeros conforman la nucleocápside [7].

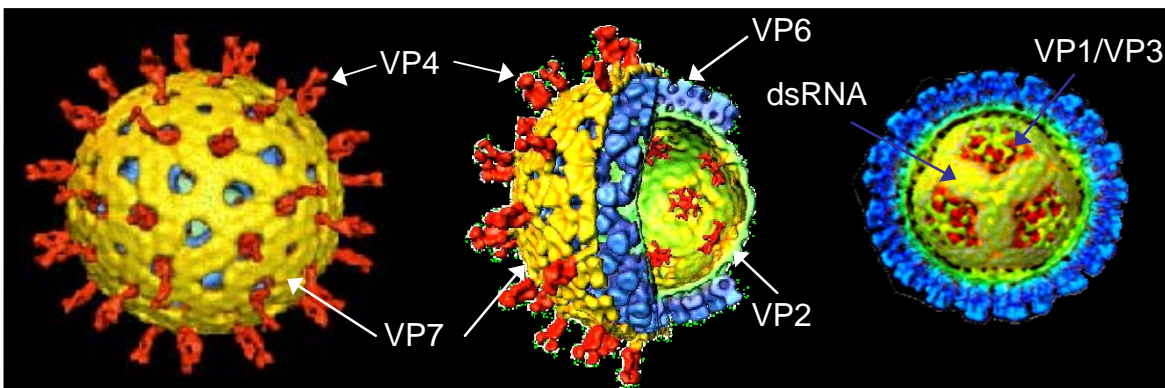


Figura 3.1 Esquema estructural del rotavirus. Adaptado de [8]

La siguiente capa está formada por 780 moléculas de VP6, conformadas en trímeros. Se ha demostrado que es necesario que la capa interna ya esté formada para la formación de la partícula de doble capa (DLP), ya que en ausencia de VP2, VP6 tiende a generar estructuras tubulares [9]. La especificidad de grupo y subgrupo de rotavirus está determinada por la proteína VP6, la cual clasifica los rotavirus en siete grupos (A a G), de los cuales el grupo A es el de mayor importancia epidemiológica. Los grupos A, B y C han sido aislados tanto en humanos como en animales, pero muy pocos rotavirus de grupos diferentes al A han podido propagarse en cultivo celular [10, 11]. La estructura de doble capa tiene un diámetro aproximado de 70 nm.

La capa más externa de rotavirus está conformada por las proteínas VP7 y VP4. VP7 es una glicoproteína organizada en 260 trímeros, cada monómero contiene entre uno y tres

sitios potenciales para glicosilación. VP4 es una proteína sensible a proteasas y forma 60 espículas de entre 10 y 12 nm de longitud que sobresalen de la superficie del virus. Estas espículas están constituidas por dímeros asimétricos de VP4 y junto con VP7 inducen anticuerpos neutralizantes [11].

Las secuencias que codifican para las proteínas virales de la cápside externa VP7 y VP4 definen los genotipos G y P, respectivamente. Así, la clasificación de los rotavirus es un sistema binario que distingue distintos genotipos de VP7 y VP4 y son determinados por análisis de secuencias de los segmentos 9 y 4 de rotavirus [11]. En la tabla 3.1. se resumen las características de las proteínas estructurales de rotavirus.

Tabla 3.1. Proteínas estructurales de rotavirus ^a

Proteína	Peso molecular (kDa)	Moléculas por virón	Contenido relativo g/g
VP2	102.5	120	0.14
VP6	44	780 (260 trímeros)	0.42
VP7	33	780	0.32
VP4	86	120 (60 dímeros)	0.12

^a No incluye las proteínas VP1 y VP3. Adaptado de [12].

La replicación del rotavirus tiene lugar en el citoplasma, formando viroplasmos en las células infectadas. La síntesis de VP1, VP2, VP3, VP6 y otras proteínas no estructurales se hace en ribosomas libres del citoplasma y estas proteínas se concentran en viroplasmos donde se ensamblan VP2 y VP6 y además se empaqueta el material genético. VP7 se sintetiza en ribosomas asociados al retículo endoplasmático (RE) pero el mecanismo de ensamblaje de VP7 y VP4 a la partícula de doble capa aún no está del todo esclarecido [11].

3.2 Las partículas pseudovirales (PPV)

Las PPV son estructuras multiméricas que simulan la organización y conformación de los virus nativos pero carecen de genoma viral, lo cual las hace excelentes candidatos para la producción de vacunas más seguras. Estas estructuras generalmente se autoensamblan sin la participación de otras proteínas virales, necesarias para el ensamblaje del virus

nativo y requieren de la sobreexpresión de una o más proteínas de cápside en sistemas heterólogos.

A pesar de que la demanda actual del mercado de PPV está principalmente enfocada hacia la obtención de productos para vacunación [13], la capacidad que tienen las PPV de incluir ácidos nucleicos y otras moléculas pequeñas las han hecho posibles candidatos para su uso en terapia génica y entrega de medicamentos. Además, ya que se conoce la simetría característica de las cápsides de muchos virus, su tamaño y los grupos funcionales de sus superficies, las PPV se han podido utilizar como templado para la formación y funcionalización de nanomateriales o nanoestructuras [14].

El proceso de ensamblaje de PPV es poco conocido, aunque se sabe que depende de las interacciones y concentración de las proteínas que la conforman. Así pues, las interacciones hidrofóbicas, las fuerzas de Van der Waals, los puentes de hidrógeno, los puentes disulfuro y las interacciones mediadas por iones entre otras, mantienen las estructuras de las PPV estables [13]. Estas interacciones son dependientes de la temperatura, fuerza iónica, pH y potencial redox, por lo que al regular eficientemente la producción de la o las proteínas estructurales del virus, se pueden desarrollar estrategias de producción que maximicen el correcto ensamblaje de las PPV.

3.3 PPV en vacunación

Las PPV son excelentes candidatos para vacunación debido a su seguridad, ya que al simular las estructuras virales, sin contener el material genético, no se presentan los problemas que pueden presentar las vacunas tradicionales, como reversión de la atenuación, recombinación o generación de cepas rearreglantes, entre otros. Además, se ha demostrado que al mismo tiempo que estimulan la respuesta inmune mediada por células B, las PPV son altamente efectivas para estimular las respuestas CD4 proliferativa y la de linfocitos T citotóxicos [5].

La primera vacuna recombinante contra hepatitis B aprobada por FDA en 1986 está basada en las PPV del virus de hepatitis B y usa como plataforma de producción *S. cerevisiae* [15]. Diferentes versiones de esta vacuna han sido producidas en múltiples plataformas de expresión que incluyen *E. coli*, levaduras o células de mamífero,

obteniéndose estructuras entre 17 y 25 nm de diámetro que son prácticamente idénticas a las que se producen naturalmente en la infección de hepatitis B. Otro caso exitoso en el desarrollo de vacunas recombinantes basadas en PPV es la vacuna contra virus de papiloma humano (VPH). La vacuna comercial Gardasil® producida por Merck & Co. Inc fue aprobada por la FDA en 2006 para su uso en humanos. Esta vacuna cuadrivalente es una mezcla de PPV de la proteína de cápside L1 de VPH de los tipos 6, 11, 16 y 18 y ha demostrado reducir la incidencia de la infección de VPH y consecuentemente el cáncer cervical [16, 17]. De forma paralela, GlaxoSmithKline (GSK) ha producido Cervarix® utilizando el sistema de células de insecto-baculovirus (SCI-BV), produciendo PPV de los tipos 16 y 18. Esta vacuna fue aprobada por FDA en 2009 para su uso en humanos. Otras enfermedades que son objetivo de las vacunas basadas en PPV incluyen gastroenteritis (rotavirus y virus Norwalk), hepatitis C y E y malaria, entre otras [13].

3.4 PPV de rotavirus bovino

La producción de vacunas basadas en PPV de rotavirus bovino es de interés comercial y sanitario, ya que este virus está asociado estrechamente con la enfermedad diarrea neonatal bovina y las vacunas disponibles en el mercado mexicano podrían tener una protección limitada o nula ante algunos genotipos [3]. La diarrea neonatal bovina afecta a los terneros recién nacidos, provocando importantes pérdidas económicas por morbilidad y mortalidad. Los porcentajes de mortalidad pueden llegar a ser importantes (hasta el 20%), así como el retraso en el desarrollo corporal que manifiestan los animales afectados [2].

Diferentes grupos de investigación han producido PPV de rotavirus con diferentes combinaciones mediante la coexpresión de las proteínas de cápside VP2, VP6 y VP7 con o sin VP4 en el SCI-BV. Las estructuras multicapa (VP2/VP6, VP2/VP6/VP7, VP2/VP6/VP7/VP4) han demostrado ser altamente inmunogénicas y proveer protección en diferentes animales modelo [18-23]. El uso de partículas de doble capa 2/6 con adyuvante completo de Freund fue administrado de forma parenteral a conejos, mostrando protección de los animales ante el reto con rotavirus [24]. Cuando fueron administradas este mismo tipo de partículas de doble capa, vía intranasal o parenteral a ratones, estas confirieron completa protección contra la infección en el modelo de ratón adulto [25, 26]. Por otra parte, cuando se utilizó como modelo de estudio el cerdo

gnobiótico, la inmunización intranasal con partículas de doble capa no protegió contra la diarrea, después del reto con rotavirus [27, 28]. De otro lado, al analizar la respuesta generada por partículas de triple capa, que pueden contener o no la proteína VP4, se demostró que existe un amplio rango de protección homo y heterotípica ante el reto con rotavirus, induciendo una respuesta de anticuerpos neutralizantes tanto en ratones como en conejos [29, 30]. También se ha demostrado que la inmunización de ratones con partículas de triple capa 2/6/7 resulta en la protección pasiva de las crías contra la infección por rotavirus [31].

Para el caso de rotavirus bovino, se ha demostrado que los títulos de anticuerpos en calostro o leche después de vacunar con PPV de rotavirus a vacas preñadas, son incluso mayores que aquellos obtenidos al vacunar con virus inactivados [19, 20].

La producción de PPV de triple capa de rotavirus no es una tarea trivial, ya que involucra la expresión simultánea de 3 proteínas con diferentes características en una misma célula. Dicha célula puede tener un ambiente celular distinto al encontrado en las células blanco originales. La regulación del pH intracelular puede ser distinta, así como los requerimientos nutricionales, por lo que las condiciones de ensamblaje pueden ser diferentes. Además, la ausencia de proteínas no estructurales del virus al realizar la expresión heteróloga, hace que los sistemas de ensamblaje sean más complejos ya que no se forman viroplasmos en el citoplasma de la célula hospedera, lo cual hace más difíciles las interacciones proteína – proteína necesarias para el correcto ensamblaje [32].

3.5 Protección generada por las vacunas comerciales

Aunque algunos autores describen protección heterotípica, estudios previos de nuestro grupo de investigación encontraron que animales inmunizados con una vacuna comercial que contiene una cepa de rotavirus bovino inactivado del genotipo G6, P[1], desarrollaban la enfermedad si habían sido expuestos a cepas de rotavirus del genotipo G10, P[11] y algunos de estos animales murieron a causa de las complicaciones de la infección [3]. Estos resultados están acordes con reportes del sistema de vigilancia epidemiológica del departamento de agricultura de Estados Unidos, quienes alertan sobre la limitada protección cruzada entre genotipos de rotavirus [4].

3.6 Producción de PPV a partir de levaduras

El sistema de expresión de proteínas heterólogas en levaduras ha sido bastante estudiado y utilizado para múltiples propósitos. Las ventajas de producción de proteínas recombinantes en levaduras combina la facilidad, simplicidad y economía de los sistemas de expresión bacterianos con la autenticidad de los productos obtenidos a partir de cultivos de células animales [33]. Las levaduras son fáciles de cultivar y sus requerimientos nutricionales poco complejos hacen que los medios de cultivo sean baratos. Además, las técnicas de manipulación genética disponibles son sencillas y ofrecen múltiples opciones para la regulación de la expresión. Por otra parte, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* ha sido utilizada en la industria alimenticia y de bebidas desde la antigüedad, por lo cual ha sido clasificada como organismo GRAS (generalmente reconocido como seguro, por sus siglas en inglés), lo que permite que los procesos productivos en que interviene sean más fáciles de reglamentar que los asociados a otros vectores de expresión.

Para el caso de PPV expresadas en levadura se han realizado estudios con distintos modelos virales, entre los que se cuentan: virus de hepatitis C y E [34], virus de inmunodeficiencia humana (VIH) [35-37], norovirus [38], virus de herpes bovino [39, 40] y poliomavirus de hámster [41, 42], entre otros. Estos desarrollos están enfocados principalmente a la obtención de agentes de diagnóstico clínico, inmunoterapia y producción de vacunas. Sin embargo, hasta la fecha, las levaduras han sido usadas para producir PPV de baja complejidad, formadas esencialmente por una sola proteína o proteínas quiméricas ensambladas en una sola capa [5]. La producción de PPV de múltiples capas en levadura impone varios retos tecnológicos. Primero, es necesario producir simultáneamente varias proteínas en cada célula en condiciones adecuadas para propiciar su autoensamblaje en PPV. Segundo, la concentración intracelular de cada proteína debe ser lo suficientemente alta para promover el ensamblaje y tercero, el ambiente intracelular debe ser el adecuado para el ensamblaje.

3.7 Manipulación genética en levaduras

La manipulación genética de *S. cerevisiae* utiliza diferentes vectores que se pueden clasificar en 5 tipos de acuerdo al modo de replicación en el hospedero: YIp (integrativos),

YRp (replicativos), YCp (centroméricos), YEp (episomales) y YLp (lineales). Con excepción de los YLp, todos estos plásmidos pueden mantenerse tanto en *E. coli* como en *S. cerevisiae* por lo que son conocidos como vectores transbordadores [43]. Estos plásmidos contienen dos tipos de genes de selección, cada uno de los cuales confiere un fenotipo dominante: un marcador de resistencia a antibióticos para el hospedero bacteriano y un gen de selección en levaduras que complementa una auxotrofia específica en la cepa de levadura escogida. Por otra parte, el uso de YLp es independiente de la presencia de marcadores de auxotrofías en la levadura y posibilita la utilización de medios complejos, los cuales son más económicos que los medios sintéticos utilizados cuando se trabaja con cepas auxótrofas [44]. Los YCp están presentes en 1 o 2 copias por célula pero son más estables durante la mitosis y meiosis, lo cual los hace altamente atractivos para procesos a gran escala. Los YEp contienen secuencias del plásmido natural 2 μ m que le permiten replicación extracromosomal y le confieren altas frecuencias de transformación (10^4 a 10^5 transformantes / μ g de DNA).

Los vectores de expresión en levaduras contienen secuencias promotoras y terminadoras adicionales al gen de interés. Los promotores constitutivos son generalmente derivados de genes de la ruta de glicólisis, ya que estos tienen altos niveles de expresión transcripcional. Entre los promotores constitutivos más empleados, se encuentran ADH1, PGK1, TEF1, ENO y PYK1. En el caso del promotor de ADH1, la alta expresión genética se mantiene a lo largo del cultivo mientras éste se encuentra en fase logarítmica, pero puede reprimirse hasta 10 veces cuando las células alcanzan la fase estacionaria o cuando se acaba la glucosa del medio de cultivo [45]. Modificaciones en el promotor ADH1 han permitido mantener su expresión a lo largo del cultivo celular [46]. Por otra parte, los promotores regulables pueden ser manipulados mediante el control de la disponibilidad de algunos nutrientes, lo cual permite incrementar la masa celular antes de la expresión del gen heterólogo. Entre los promotores inducibles más utilizados se encuentran GAL1 y GAL10 que codifican para enzimas del metabolismo de galactosa y pueden inducir hasta 1,000 veces la expresión del gen al adicionar este azúcar al medio de cultivo, cuando la glucosa ha sido completamente consumida. Otro promotor utilizado con frecuencia es CUP1, el cual es inducido por adición de concentraciones micromolares de Cu^{+2} , incrementando hasta 25 veces la expresión del gen en relación a su actividad basal [47], permitiendo además activarlo gradualmente o desactivarlo según sea conveniente para el proceso.

3.8 Metabolismo de crecimiento y energía en *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae es un microorganismo que presenta un comportamiento particular conocido como efecto *Crabtree*, el cual consiste en la producción de etanol por vía aeróbica tan pronto como la concentración de glucosa extracelular excede los 0.8 mM [48]. La producción de etanol por vía aeróbica en *Saccharomyces* se cree que depende de las capacidades relativas de las rutas fermentativa y respiratoria [49]. Altos niveles de glucosa resultan en una velocidad de glicólisis que excede la reacción de la piruvato deshidrogenasa, generando con ello un sobreflujo hacia piruvato descarboxilasa y hacia la producción de etanol (Figura 3.2). A niveles muy bajos de glucosa extracelular y en presencia de oxígeno, *S. cerevisiae* no produce etanol [50].

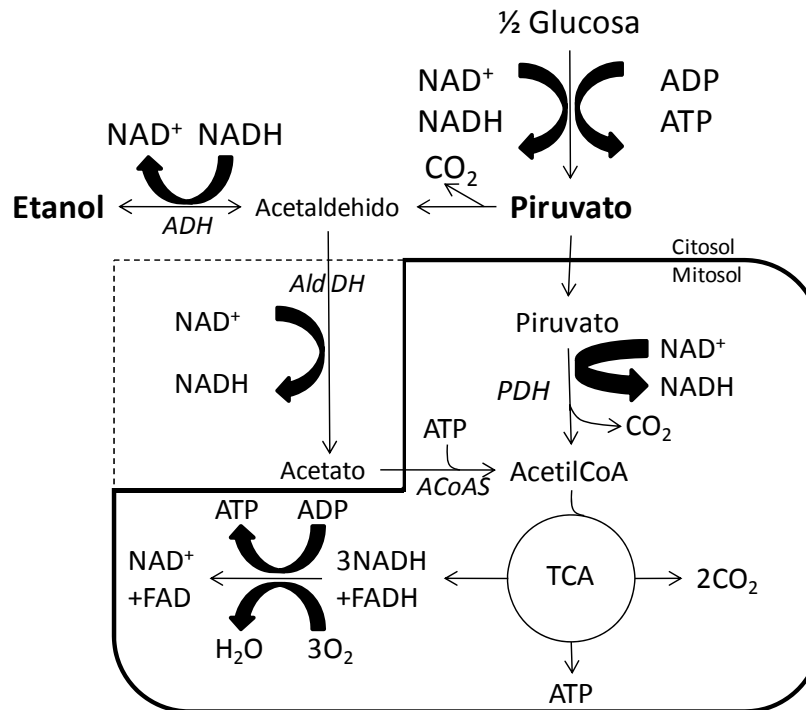


Figura 3.2. Principales componentes de la ruta metabólica energética de *S. cerevisiae*. Las enzimas claves en el sobreflujo metabólico son: PDH : Complejo piruvato deshidrogenasa; PDC : Piruvato descarboxilasa; ADH : Alcohol deshidrogenasa; AldDH : Acetaldehído deshidrogenasa; AcoAS : Acetil CoA sintetasa. Adaptado de [51].

La producción aeróbica de etanol desde glucosa por *S. cerevisiae* se ha observado en tres modos de operación de cultivos: lote, lote alimentado y continuo [51]. En cultivos por lote, todo el azúcar se consume mientras se produce etanol. Al agotarse el azúcar y después de una fase lag, la levadura utiliza el etanol como fuente de carbono. La fase lag

de este proceso es causada por la inducción de las enzimas del ciclo de glioxalato y gluconeogénesis, que son necesarias para la síntesis de compuestos C₃-C₆ desde etanol, el cual es un sustrato C₂. Los procesos por lote se caracterizan por una baja densidad celular al final del cultivo (inferior a 5 gDCW/L), debida a la inhibición por etanol, por lo cual, este modo de operación es poco utilizado a nivel industrial.

Por otra parte, la mayoría de estudios sobre la formación aeróbica de etanol se han realizado en quimiostatos. Se ha encontrado que el rendimiento de biomasa se reduce drásticamente cuando la tasa de dilución excede un valor crítico, típicamente cerca de 0.3 h⁻¹, después del cual, se produce etanol. Por encima de este valor de dilución crítica, la tasa específica de respiración es aproximadamente constante a un valor máximo ($q_{O_2,max}$) mientras que la producción específica de CO₂ se incrementa drásticamente con la tasa de dilución, resultando en un incremento del coeficiente respiratorio (RQ) [52].

Para el caso de los cultivos por lote alimentado, no existen muchos estudios relacionados con el sobreflujo metabólico, a pesar de ser el modo de operación industrial más utilizado para la producción de levaduras para panadería y algunas proteínas recombinantes[53]. Sin embargo, se han desarrollado modelos cinéticos que han sido experimentalmente validados y dan información útil sobre los comportamientos de la respiración, producción de biomasa y formación de etanol [51].

Así, el presente proyecto tiene como finalidad el desarrollo de un proceso de producción de PPV de rotavirus bovino en *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando herramientas de biología molecular que incluyen evaluación de promotores, plásmidos y cepas, así como herramientas de bioproceso entre las que se cuentan el diseño de medios de cultivo, el modo de operación, la estrategia de alimentación de la fuente de carbono y nitrógeno y las operaciones de separación y purificación. Adicionalmente a ello, el presente estudio aborda ensayos *in vivo* en ratones adultos para probar el potencial uso de los extractos celulares obtenidos como potencial antígeno de tipo veterinario.

CAPÍTULO 4

JUSTIFICACIÓN

El avance de los sistemas de producción de proteínas heterólogas en levaduras, ha permitido el desarrollo de nuevos sistemas con mecanismos de regulación genética, capaces de controlar la expresión de genes de forma funcional, permitiendo la síntesis de proteínas heterólogas de manera controlada y acorde con los requerimientos del proceso productivo.

Los cultivos de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* construidas en el presente estudio, permitieron el desarrollo de un bioproceso económicamente viable, capaz de ser escalado y transferido a una empresa biotecnológica que esté interesada en la producción y comercialización de vacunas veterinarias contra rotavirus bovino.

Por otra parte, en el presente estudio se obtuvieron por primera vez PPV de múltiples capas expresadas en *Saccharomyces cerevisiae*, así como proteínas solubles capaces de generar una respuesta inmune humoral, capaz de proteger de la infección por rotavirus al utilizar el modelo de ratón adulto. Estos resultados prometedores abren un nuevo campo de investigación en nuestro grupo de trabajo.

CAPÍTULO 5

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

5.1 Hipótesis

El uso de levaduras como sistema de expresión heterólogo permitirá obtener PPV de rotavirus bovino de manera eficiente y sencilla.

5.2 Objetivo general

Desarrollar estrategias moleculares y de bioproceso que permitan obtener PPV de rotavirus bovino en levaduras. Dichas PPV podrán ser utilizadas como una vacuna polivalente que proteja eficientemente al ganado bovino del país.

5.3 Objetivos específicos

Construir levaduras recombinantes capaces de expresar simultáneamente las proteínas VP2, VP6 y VP7.

Evaluar diferentes promotores regulables para la expresión de genes de proteínas estructurales de rotavirus.

Identificar sitios intracelulares de acumulación de PPV con el fin de desarrollar estrategias de producción y purificación adecuadas.

Desarrollar un proceso de producción y purificación de PPV de triple capa producidas en levaduras.

Realizar pruebas de inmunización en ratones para evaluar la efectividad de las PPV obtenidas.

CAPÍTULO 6

MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Amplificación de genes de rotavirus bovino

6.1.1 Genes de VP2 y Δ VP2

Para la obtención del gen de la proteína VP2 (cepa bovina RF) se realizaron infecciones en células de insecto de la línea celular High Five (*Trichoplusia ni*) (GIBCO-Invitrogen, Carlsbad, CA USA) usando el baculovirus recombinante bacVP2, el cual fue donado por el grupo de los Drs. Arias y López (IBt-UNAM). La línea celular fue cultivada en el medio de cultivo SF-900II (GIBCO-Invitrogen, Carlsbad, CA USA). La multiplicidad de infección (MOI) utilizada fue de 1 pfu/cél. Los cultivos se realizaron en matraces de 250 mL, con 50 mL de volumen de trabajo, agitados a 117 rpm y mantenidos a una temperatura de 27°C. Los cultivos se cosecharon 48 hpi (horas post-infección) y se extrajo RNA total (RNA_T) de las células utilizando el *kit* RNeasy Mini (QIAGEN, Hilden, Germany), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la amplificación del gen de VP2 se diseñaron oligonucleótidos que amplifican el gen completo. Los oligos del extremo 5' contenían a su vez sitios de restricción para la enzima HindIII. El producto esperado tiene un tamaño de 2660 pb. En la tabla 6.1 se muestran las secuencias de los oligos diseñados:

Tabla 6.1 Oligonucleótidos para amplificación de VP2 y EGFP-VP2

Nombre del oligo	Secuencia del oligo	Localización en el gen
5'VP2HindIII	5'>GTACCAAGCTTAGAAGGTTCAATGGCG<3'<3'	9-36
3' VP2	5'>GGTTGGCGTTTACAACCTCGT<3'	2668-2640

Se realizó una reacción primaria de retrotranscripción usando para ello el kit Revertaid H minus First strand cDNA (Fermentas, Inc, Burlington, ON, Canadá). Luego se realizó amplificación del gen mediante PCR, utilizando las enzimas *Vent* ó *Taq*DNA polimerasa. Las condiciones de reacción fueron optimizadas y se esquematizan en la tabla 6.2.

Tabla 6.2 Condiciones de PCR para el gen de VP2

Etapa	Condiciones	Numero de ciclos
Desnaturalización inicial	94°C, 5 min	1
Desnaturalización	94°C, 1 min	30
Alineamiento	68°C, 1 min	30
Extensión	72°C, 3.5 min	30
Extensión final	72°C, 7 min	1

El producto de PCR se clonó en los vectores pJet1 (Fermentas, Inc, Burlington, ON, Canadá) y pCR2.1 TOPO[®] (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA), siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

Para la amplificación del gen Δ VP2, se decidió modificar el sitio de unión a ribosoma (RBS) mediante el uso de nuevos oligos y amplificación por reacciones de PCR, utilizando la información publicada por Misayaka en 1999 [54]. Se decidió a su vez acortar el tamaño del gen clonado, eliminando las secuencias que codifican para los primeros 92 aminoácidos de la proteína VP2 y que se ha comprobado que no son necesarios para la formación de partículas pseudovirales de rotavirus [7, 55]. Los oligos diseñados para tal fin se muestran en la tabla 6.3.

Tabla 6.3 Oligonucleótidos para amplificación de Δ VP2

Nombre del oligo	Sitio de restricción	Secuencia del oligo
WR004 VP2-trunc(f)	NotI	5'> ATTTGCGGCCGC TTCAAACAAAAT GAAGAGTC AATATTGAAAAAATTGGAGGATATCAAACCG <3'
WR005 VP2 (r)	SpeI	5'>TCACTAGTTGGCGTTTACAACCTCGTTCATGATGCG<3'

6.1.2 Gen de VP6 (cepa NCDV)

El gen de VP6 fue extraído de la Vacuna Scourguard® (Pfizer) y pertenece a la cepa NCDV (Genotipo G6, P[1]). El procedimiento para la extracción fue el siguiente:

Se tomó 1 mL de vacuna Scourguard y se centrifugó a 8,000 rpm por 5 min. El sobrenadante obtenido fue utilizado para la extracción de RNA viral usando el *kit* QIAamp Viral RNA (QIAGEN, Hilden, Germany). Se diseñaron oligonucleótidos específicos para la amplificación del gen de VP6 (cepa NCDV) (Ver tabla 6.4).

Tabla 6.4 Oligonucleótidos para amplificación de VP6 cepa NCDV

Nombre del oligo	Secuencia del oligo	Localización en el gen
5'VP6	5'>TTTAAACGAAGTCTTCAACATGGAT<3'	5-30
3' VP6	5'>TGAGTGATTACTCTGTGTAGCGAAT<3'	1331-1306

El RNA obtenido se sometió a reacciones de retrotranscripción y PCR de forma similar a las realizadas para VP2. Las condiciones optimizadas para la reacción de PCR para el gen de VP6 se muestran en la tabla 6.5.

Tabla 6.5 Condiciones de PCR para el gen de VP6

Etapas	Condiciones	Numero de ciclos
Desnaturalización inicial	94°C, 5 min	1
Desnaturalización	94°C, 1 min	30
Alineamiento	60°C, 1 min	30
Extensión	72°C, 1.5 min	30
Extensión final	72°C, 7 min	1

El producto de PCR corresponde a 1327 pb y fue clonado en el vector pCR®BluntII TOPO (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA).

6.1.3 Genes de VP7 (genotipos G10 y G6)

Los genes de VP7 de los genotipos G10 y G6 fueron aislados en un estudio previo [3] a partir de cepas de campo del territorio mexicano. Estos genes fueron clonados en pCR2.1[®] (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA). Para la amplificación del *cassette* TEF1-VP7-CYC1 term se diseñaron oligos específicos, los cuales se muestran en la tabla 6.6:

Tabla 6.6 Oligonucleótidos para amplificación del *cassette* TEF1-VP7-CYC1 term

Nombre del oligo	Sitio de restricción	Secuencia del oligo
WR001	Ascl	5'> TCGGCGCGCCCTATTATTATCCTGCTCAGTGGTACTTGC <3'
WR002	Ascl	5'> TCGGCGCGCCCTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAG <3'

6.2 Subclonación en vectores para levaduras

Para el desarrollo del presente estudio se utilizaron los plásmidos de la familia pRS y pSAL desarrollados por Mascorro-Gallardo [56] y el plásmido pSP-GM2 desarrollado por Partow et al [57], que fue cordialmente donado por el Dr. Jens Nielsen (Chalmers University of Technology, Gothemburg, Suecia). Los plásmidos pRS cuentan con el promotor del gen de la ATP-asa de membrana plasmática (PMA1), considerado un promotor constitutivo. De esta familia de vectores existen versiones mono y multicopia, para las auxotrofías URA3, HIS3, LEU2 y TRP1. Los plásmidos de la familia pSAL contienen el promotor del gen de la metalotioneína (CUP1), el cual es inducido por adición de concentraciones micromolares de Cu⁺², incrementando hasta 25 veces la expresión del gen en relación a su actividad basal [47]. Estos plásmidos también vienen en versiones mono y multicopia, para las auxotrofías URA3, HIS3, LEU2 y TRP1. Por otra parte, el plásmido pSP-GM2, es de tipo multicopia para suplementar la auxotrofia por URA3 y se diseñó para expresar dos o tres proteínas en utilizando un único vector. Este plásmido cuenta con dos promotores constitutivos PGK1 y TEF1. Estudios recientes han demostrado que los genes clonados bajo estos promotores pueden ser expresados constitutivamente durante todo el cultivo y que sus niveles de expresión son independientes de la fuente de carbono o de nitrógeno empleada [57]. En la figura 6.1 se detallan los pasos seguidos para la obtención de los plásmidos de la familia pSP-GM2 y en las tablas 6.7 y 6.9 se resumen las construcciones obtenidas en el presente estudio.



Figura 6.1. Plásmidos de la familia pSP-GM2. El gen $\Delta VP2$ fue clonado bajo el promotor PGK1, los genes VP6 y VP7 fueron clonados sobre promotores TEF1 individuales. El plásmido pWR26 se obtuvo de la clonación del gen de VP6 en el plásmido pWR $\Delta 2$. El *cassette* TEF1-VP7-CYC1term fue amplificado por PCR desde pWR7 y se clonó en pWR26 para obtener el plásmido pWR267.

Tabla 6.7 Plásmidos construidos en el presente estudio

Plásmido	Promotor/Gen1	Promotor/Gen 2	Promotor/Gen3
<i>pRS7VP6</i>	PMA1/VP6		
<i>pSAL4G6</i>	CUP1/VP7(G6)		
<i>pSAL4G10</i>	CUP1/VP7(G10)		
<i>pSAL5G6</i>	CUP1/VP7(G6)		
<i>pSAL5G10</i>	CUP1/VP7(G10)		
<i>pRS2VP2</i>	PMA1/VP2		
<i>pWR267</i>	PGK / ΔVP2	TEF1/ VP6	TEF1 / VP7(G6)
<i>pWR26</i>	PGK / ΔVP2	TEF1 / VP6	
<i>pWR2</i>	PGK / ΔVP2		
<i>pWR6</i>		TEF1 / VP6	
<i>pWR7</i>			TEF1 / VP7(G6)

Para verificar las construcciones en los plásmidos, se diseñaron diferentes pares de oligos que permitieron seleccionar las clonas que contenían los genes de interés, en la dirección adecuada. En la tabla 6.8 se listan los oligos utilizados en este estudio para dicho fin:

Tabla 6.8 Oligonucleótidos para verificación de construcciones

Nombre	Secuencia	Función
Beg9-5'	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTTTGG	Amplificación del gen de VP7.
Bov9com3	TCACATCATACA ACTCTAATCT	Amplificación del gen de VP7.
5'CUP1	TACCAACGCAATATGGATTGTC	Verificar construcciones en pSAL
5'PMA1	CCCCAGCTAGTTAAAGAAAATCA	Verificar construcciones en pRS
3'CYC1	CATGATATCGACAAAGGAAAAGG	Verificar construcciones en pSAL y pRS
KK007 (f)	TAC CAATTG CTATTATTATCCTGCTCAGTGGTACTT	Verificar construcciones en pSP-GM2
KK013 (r)	TCC CAATTG TCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAG	Verificar construcciones en pSP-GM2
KK014 (r)	TTCGTTCTTCTTCTGTTCGGAGATTAC	Para PCR de colonias y verificar dirección en pSP-GM2
WR003	GCATGAGGTCGCTCCAATTCCTAGG	Verificar dirección de TEF1-VP7-CYC1 en pWR267
DCA001	TAGGAATTGGAGCGACCTCA	Verificar construcciones en vector pSP-GM2
DCA002	GCTTCCAATTCGTCACACA	Verificar construcciones en pSP-GM2
3'VP2INT	CGTTGCATTCCGAACGCTGG	Verificar construcción en pWRΔ2

6.3 Transformación de levaduras

Las cepas de levaduras utilizadas fueron: *Saccharomyces cerevisiae* PD 83B.1d (MATa ura3-1), gentilmente donada por el Dr. Stefan Hohmann de Gothenburg University, Suecia, la CEN.PK113-5D (MATa SUC2 MAL2-8c ura3-52), donada por el Dr. Peter Kotter de J. W. Goethe Universität, Germany, la PJ69-4a (MATa trp1-901, leu2-3,112, ura3-52, his 3-200, gal4 Δ gal80 Δ , LYS::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2. GAL2 met2::GAL7 lacZ) y la W303-1a (MATa ade2-1 can1-100 ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1).

Todas las transformaciones se realizaron utilizando la técnica de acetato de litio, descrita previamente [58]. La selección de transformantes se realizó utilizando medio mínimo sintético con auxotrofia por uracilo (pSP-GM2 y pSAL4), triptófano (pRS7) o leucina (pRS2). La verificación de la clonación se realizó por PCR de colonias de levadura. En la tabla 6.9 se resumen las características de las cepas obtenidas.

Una vez seleccionadas las colonias transformantes, se realizaron cultivos en matraces agitados de 250 mL con 50 mL de medio sintético sin suplementar la auxotrofia correspondiente, a 30°C y 200 rpm durante 24 h. Estos cultivos se utilizaron para preservar cada una de las cepas seleccionadas a -70°C en una mezcla con glicerol, a una concentración final de 40%. Estas cepas preservadas en glicerol fueron sembradas nuevamente en placas de medio CSM sólido cada vez que se realizara un nuevo cultivo, partiendo de una colonia sencilla por cada matraz o cultivo en fermentador.

6.4 Medio de cultivo

Los cultivos por lote se realizaron utilizando medio sintético completo (CSM) sin uracilo. El medio está compuesto de glucosa 20 g/L, Yeast Nitrogen Base 6.7 g/L (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA) y CSM -ura 0.77 g (Foremedium, Hunstanton, UK). Las cepas PJ.T-6 y W.T-6 se cultivaron en medio CSM sin triptófano. La composición del medio de cultivo para las fermentaciones por lote alimentado fue optimizada en matraces, mediante dos diseños factoriales a dos niveles, usando la concentración de VP6 y de biomasa como variables de respuesta. Basados en los resultados obtenidos, el medio de cultivo fue suplementado con leucina 1.8 mM, glutamato 20mM y succinato 50mM. El pH fue ajustado a 5.0 con KOH 2N antes de esterilizar. El medio de alimentación para los cultivos por lote alimentado correspondió a 10 veces el medio CSM sin suplementos.

Tabla 6.9. Construcciones realizadas en este estudio. Se muestran las cepas parentales y sus derivadas.

Cepa	Genotipo	Plásmido	Descripción del plásmido
W303-1a	MATa ade2-1 can1-100 ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1	-	
W.TLU-C		pRS7, pRS2, pSal4	P _{PMAl} , CEN6/ARSH4, TRP1 P _{PMAl} , 2μ, LEU2, P _{CUP1} , 2μ, URA3
W.T-6		pRS7VP6	P _{PMAl} VP6, CEN6/ARSH4, TRP1
W-L-2		pRS2VP2	P _{PMAl} VP2, 2μ, LEU2
W-U-7		pSal4G6	P _{CUP1} VP7G6, 2μ, URA3
CEN.PK.113-5D ^a	MATa SUC2 MAL2-8c ura3-52	-	
CEN.U-C		pSP-GM2	P _{PGK1} , P _{TEF1} , 2μ, URA3
CEN.U-6		pWR6	P _{PGK1} , P _{TEF1} VP6, 2μ, URA3
CEN.U-267		pWR267	P _{PGK1} ΔVP2, P _{TEF1} VP6, P _{TEF1} VP7 2μ, URA3
PD 83B.1d ^b	MATa LEU ura3-1 TRP HIS ADE can1-100 GAL SUC2	-	
PD.U-C		pSP-GM2	P _{PGK1} , P _{TEF1} , 2μ, URA3
PD.U-6		pWR6	P _{PGK1} , P _{TEF1} VP6, 2μ, URA3
PD.U-267		pWR267	P _{PGK1} ΔVP2, P _{TEF1} VP6, P _{TEF1} VP7 2μ, URA3
PJ69-4a	MATa trp1-901, leu2-3,112, ura3-52, his3-200, gal4Dgal80D	-	
PJ.U-C		pSP-GM2	P _{PGK1} , P _{TEF1} , 2μ, URA3
PJ.T-6		pRS7VP6	P _{PMAl} VP6, CEN6/ARSH4, TRP1
PJ.U-6		pWR6	P _{PGK1} , P _{TEF1} VP6, 2μ, URA3
PJ.U-267		pWR267	P _{PGK1} ΔVP2, P _{TEF1} VP6, P _{TEF1} VP7 2μ, URA3

^a. Donada por el Dr. Peter Kotter, J. W. Goethe Universität, Germany

^b. Cepa con fondo genético similar a W303-1a, donada por el Dr. Stefan Hohmann, Gothenburg University, Suecia

6.5. Cultivos en Matraz

Los cultivos para los preinóculos de los fermentadores y para los ensayos del diseño experimental se llevaron a cabo en matraces baffleados de 250 mL con 50 mL de volumen de trabajo. El medio de cultivo utilizado fue medio CSM ajustado a pH 5.0 con H_3PO_4 2M antes de filtrar por membranas de 0.22 μm . Los matraces fueron inoculados a partir de colonias aisladas de cada cepa, que fueron crecidas en medio CSM-agar. La temperatura del cultivo se mantuvo en 30 °C y la agitación a 200 rpm en una incubadora con un diámetro de agitación circular de 19 mm.

6.6 Cultivos en fermentador

Se realizaron cultivos por lote en biorreactores de 1 L: Sistema Bioflo 110 (New Brunswick Scientific, NJ, USA) y Parallel Bioreactor System (DasGip, Jülich, Germany). Todos los cultivos fueron controlados a pH 5.0 con KOH 2N. El flujo de aire correspondió a 1 vvm y se reguló la mezcla con oxígeno puro y variación en la agitación (200-600 rpm) para mantener una tensión de oxígeno disuelto (TOD) superior al 30%. Los cultivos se inocularon a una densidad óptica inicial de 0.01 con preinóculo en fase exponencial.

El volumen inicial de los cultivos por lote alimentado correspondió al 50% del volumen de trabajo del fermentador. La alimentación siguió un perfil exponencial y fue iniciada cuando la glucosa de la fase por lote fue consumida totalmente, usando como parámetro los valores de CTR (Velocidad de transferencia de dióxido de carbono), que disminuían hasta 2.5 mM/h. El perfil de alimentación del cultivo se representa por la siguiente ecuación:

$$F = abx_0V_0e^{bt} \quad (1)$$

donde:

$$a = \frac{Y_{s/x}}{C_s^f - C_s} \quad (2)$$

y F es el flujo de alimentación; b, constante (0.19 h^{-1}), x_0 es la concentración de biomasa inicial al final del cultivo por lote; V_0 , el volumen inicial; t, tiempo; $Y_{s/x}$, rendimiento sustrato biomasa, C_s^f , la concentración del sustrato en la alimentación; y C_s , la concentración de sustrato al tiempo t.

6.7 Métodos analíticos

La biomasa fue medida por peso seco, obtenido por filtración a través de una membrana de nitrocelulosa de 0.45 μm , usando el método reportado previamente [59]. Brevemente, un volumen de 5 mL de cultivo fue filtrado a través de una membrana de nitrocelulosa, previamente pesada. El *pellet* fue lavado dos veces con agua MQ filtrada y las membranas se secaron en microondas a una potencia de 115 W por 20 min. Las membranas se dejaron enfriar durante 24 h en un desecador y se pesaron en una balanza analítica OHAUS AP210 (Pine Brook NJ, USA).

Las concentraciones de glucosa, glicerol, etanol, piruvato, succinato y acetato fueron medidas por HPLC (UltiMate® 3000 Standard LC system, Dionex, California, USA) usando una columna Aminex HPX-87H (Biorad, Richmond, CA, USA) a 50°C usando como fase móvil una solución 5mM de H_2SO_4 a un flujo de 0.6 mL/min.

6.8 Extracción de proteína intracelular

Las proteínas recombinantes fueron extraídas del *pellet* celular por dos métodos, mediante ruptura mecánica o extracción química. Mientras la ruptura mecánica usa la prensa *french* a una presión de celda de 18,000 psi, el método químico utiliza la solución de extracción de proteína YeastBuster (EMD Biosciences, Inc, Darmstadt, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante.

6.9 Detección de proteínas de rotavirus

La proteína VP6 fue cuantificada por ELISA (ProSpecT, Oxoid, Cambridge, UK). Las proteínas VP2, VP6 y VP7 se detectaron por *immunoblotting* con anticuerpos monoclonales en diferentes etapas de purificación. Brevemente, 200 μL de cada muestra se filtraron a través de una membrana de nitrocelulosa usando un equipo Bio-dot® (Biorad, Richmond, CA, USA). Las membranas fueron bloqueadas con una solución de leche descremada al 5% en buffer PBS. Luego se incubaron por 1 h con anticuerpos monoclonales diluidos en buffer PBS con 0.1% leche (anticuerpo 3A8 para VP2, 255 para VP6 e IC3 para VP7, amablemente proporcionados por los Drs. Arias y López, IBT-UNAM), seguido por una hora de incubación con un anticuerpo de cabra anti-ratón

conjugado con peroxidasa (Jackson, Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA, USA). Las membranas se lavaron tres veces con PBS después de cada incubación. La actividad de peroxidasa fue detectada por reacción con carbazol. Se utilizó una cepa inactivada de rotavirus SA-11 como control positivo.

6.9.1 Inmunofluorescencia para levaduras

Con el objeto de identificar la expresión y/o localización celular de proteínas expresadas en *S. cerevisiae* se utilizó la técnica de inmunofluorescencia, siguiendo el protocolo descrito por Atkin en 1999 [60], con algunas modificaciones: Los cultivos fueron cosechados a una D.O₆₀₀ entre 0.4 y 0.6 unidades, se agregaron 1.4 mL de formaldehído del 37% por cada 10 mL de cultivo y se incubó a 37°C por 5 min y con agitación suave. El cultivo se dejó a temperatura ambiente por 1 h y luego se centrifugó a 3,000 x g durante 3 min, luego se desechó el sobrenadante. Las células se lavaron tres veces en 3 mL de buffer de lavado 1 (1.2M sorbitol, 0.1M fosfato de potasio pH 6.5, 1% β-ME), centrifugando las células en cada lavado y descartando el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 0.5 mL de Buffer de lavado 1 y se les agregó 50 μL de solución fresca de liticasa (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA) 1900 U en 200 μL de PBS, dejándolas incubar por 20 minutos a 30°C agitando suavemente. Las células se centrifugaron a 3,000 x g por 3 min y el sobrenadante fue desechado. Las células se lavaron dos veces con 3 mL del buffer de lavado 2 (1.2M sorbitol, 0.1M fosfato de potasio pH 6.5) y se resuspendieron en 1 mL de buffer de lavado 2. Posteriormente, se colocaron 60 μL de células en laminillas de vidrio recubiertas con polilisina, se dejaron incubar por 30 min a temperatura ambiente, se lavaron dos veces con PBS y se dejaron secar al aire. Se agregaron 30 μL de Buffer de bloqueo [0.1 g de BSA en 10 mL de PBS] y se dejó incubando por 15 min, evitando que las muestras se secan. Se agregaron 30 μL de PBS con el anticuerpo primario (1:100) y se dejaron incubar a temperatura ambiente hasta el siguiente día. Las láminas se lavaron 4 veces por 5 minutos con PBS tween 0.1%, se agregaron 30 μL de buffer de bloqueo y se dejaron incubar por 10 minutos. Se agregaron 30 μL de PBS con el anticuerpo secundario (1:100) que se encuentra acoplado al fluoróforo, se dejó incubar por 1 h en oscuridad y se lavaron las laminillas 4 veces con PBS. Se agregó el reactivo de montaje Slow fade + DAPI reagent (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA), se dejó secar en la oscuridad por una hora. Las muestras se observaron en un microscopio confocal LSM510 META (Zeiss, Jena, Germany) con el

objetivo de inmersión en aceite 100X o en un microscopio de epifluorescencia Carl Zeiss AxioImager.Z1 (Zeiss, Jena, Germany) con objetivo Plan Neofluar (63x/1.25 de inmersión en aceite), utilizando el sistema Apotome[®] y el software ImageJ (Wayne Rasband, NIH, USA) para el procesamiento de imágenes.

6.10 Purificación de PPV de rotavirus

Las PPV de rotavirus fueron purificadas como se explica a continuación: La proteína intracelular obtenida del cultivo mediante lisis química fue centrifugada sobre un colchón de sacarosa al 35% a una velocidad de 112,700 x g por 2 h a 4°C en un rotor SW-28 y una ultracentrífuga Optima L-90K (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). El pellet obtenido se resuspendió en buffer TNC (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.15 M NaCl, 10 mM CaCl₂). Se adicionó cloruro de cesio a los pellets resuspendidos hasta obtener una concentración de 0.42 g/mL. La muestra se centrifugó a 148,930 x g por 18 h a 4°C en un rotor SW 55 Ti (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). Se aislaron las bandas opalescentes y se procesaron para su visualización en microscopía electrónica de transmisión, tal como se indica a continuación: Se fijaron 25 µL de muestra por un minuto en una rejilla de cobre de 200 mesh cubierta con formvar-carbon (Structure probe Inc., West Chester, PA. USA). La rejilla se lavó con agua ultrapura y se tiñó con una solución de acetato de uranilo al 3% (Structure probe Inc, West Chester, PA. USA). Las muestras se visualizaron en un microscopio electrónico de transmisión Jeol 1200EXII (Jeol, Peabody, MA.USA) operado a 80 KV.

Los *pellets* del colchón de sacarosa y las bandas de gradientes de cloruro de cesio se analizaron también en geles de poliacrilamida al 12% y se tiñeron con Coomassie Brilliant Blue o se transfirieron a una membrana de PVDF (Immobilon-P, Millipore, Billerica, MA, USA) usando el procedimiento de transferencia húmeda (buffer de transferencia 192 mM glicina, 20% metanol, 25 mM Tris-base) a 200 mA por 2 h. Las membranas se bloquearon con una solución de leche descremada al 5% en buffer PBS y se incubaron con suero de conejo antirotavirus por 2 h a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron dos veces con una solución de PBS-leche al 0.1% y se incubaron con un anticuerpo de cabra anti-conejo (Jackson, Immunoresearch laboratories, West Grove, PA, USA) por 1 h a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron tres veces y la actividad peroxidasa fue detectada mediante reacción con el sustrato de quimioluminiscencia Western lightning

plus ECL (PerkinElmer, Inc, Waltman, MA, USA). Los geles y membranas fueron escaneados y analizados usando el sistema ChemiDoc y el *software* Image Lab 2.0 (Biorad, Richmond, CA, USA).

6.11 Ensayos *in vivo*

Para las pruebas *in vivo* se utilizaron ratones hembra CD-1 de 6 a 8 semanas de edad. Los ratones fueron inoculados por vía subcutánea con extractos celulares obtenidos por ruptura mecánica y filtrados por membranas de 0.22 μm . Para la inoculación se inyectaron 100 μL de i) 1 mg de extracto celular de levaduras cepa PD.U-267 que expresan VP2, VP6 y VP7, el cual contenía 0.3 ó 3 μg de VP6, más cantidades no cuantificadas de VP2 y VP7 o ii) 1 mg de proteína total del extracto celular control de la cepa PD.U-C. Los ratones fueron inoculados con una o dos dosis, dependiendo del ensayo.

Se colectó sangre y heces fecales a todos los ratones durante el periodo del ensayo, cada 15 días. Se midieron anticuerpos específicos IgG e IgA anti-VP6 de rotavirus, tanto en suero como en heces fecales mediante ELISA. La media geométrica de los títulos de anticuerpos se calculó siguiendo el método reportado previamente [61].

6.11.1 Detección de anticuerpos IgG ó IgA anti VP6 en suero de ratones

Los ratones fueron sangrados cada 15 días, tomando 500 μL de sangre por la vena de la cola. La sangre fue incubada a temperatura ambiente por 45 min y luego centrifugada a 3000 rpm por 20 min. El paquete celular fue descartado y el suero separado para la detección de anticuerpos, manteniéndolo a 4°C hasta su procesamiento. Para detección de IgG's o IgA's se colocaron 100 μL de una solución de VP6 a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en solución de sensibilización (100 mM carbonato-bicarbonato a pH 9.5) a una placa de 96 pozos y se incubó toda la noche a 4°C. Al día siguiente la placa se lavó 5 veces con buffer de lavado (50mM Tris/HCl pH 8.0 + 150 mM NaCl + 0.05% Tween 20) y se bloqueó con 100 μL de solución de bloqueo (50mM Tris/HCl pH 8.0 + 5 mg/mL de gelatina + 0.2% Tween 20) durante 2 h a 37°C. Se repitieron los lavados y se colocaron 100 μL de suero en diferentes diluciones, empezando por una dilución 1:10 (para IgG) ó 1:5 (IgA) y posteriormente en diluciones seriadas 1 a 3. Se usó la solución de reacción (50 mM Tris-

HCl pH 8.0 + 0.5 M NaCl + 1 mg/mL gelatina + 0.05% Tween 20) para preparar las diluciones. La placa fue incubada por una hora a 37°C. La placa fue lavada 5 veces con buffer de lavado e incubadas con 100 µL de una dilución 1:1000 del anticuerpo anti-IgG ó anti-IgA (según sea el caso) de ratón acoplado a fosfatasa alcalina en la solución de reacción por 1 h a 37°C. Se repitieron los lavados y se adicionó el sustrato PNPP (120 µg/mL p-nitrofenil fosfato en solución al 1% de DEA, pH 9.8) dejando que la reacción transcurra por 10 min. La reacción se detuvo con una solución 2N de NaOH. La placa se leyó a 405 nm.

6.11.2 Detección de anticuerpos IgA anti VP6 en muestras de heces fecales de ratones

Se colectaron 2 *pellets* de heces por ratón en cada día de muestreo. Las muestras de heces fueron mantenidas a -20°C hasta su procesamiento. Las heces fueron descongeladas y suspendidas al 5% (P/V) en buffer disolvente (1M KH₂PO₄, 0.14M NaCl, 200 µM PMSF, 1mM NaN₃, 10% Glicerol), se homogenizaron con vortex y se sonicaron en 10 ciclos de 10 s con 50% de amplitud en un homogenizador Misonix (Farmingdale, NY, USA). Las muestras fueron almacenadas toda la noche en agitación y a 4°C. Al siguiente día las heces fueron centrifugadas a 2000 rpm por 5 min a 4°C. El sobrenadante fue recuperado en otro tubo eppendorf y almacenado a 4°C. La detección de IgA's se realizó de forma similar a la descrita en el numeral anterior, utilizando 100 µL de sobrenadante de la solución de heces en diluciones seriadas.

6.11.3 Reto con Rotavirus murino cepa EDIM

Algunos grupos de ratones fueron retados con rotavirus murino por vía oral: Los ratones fueron inoculados con 100 µL de bicarbonato de sodio al 1.33% y 5 minutos después se suministraron 100 µL de medio DMEM (GIBCO-Invitrogen, Carlsbad, CA USA) que contenía intestino de ratón infectado con rotavirus murino cepa EDIM wt (cordialmente suministrado por el Dr. Fernando Esquivel, Facultad de medicina, UAEM) a una concentración final de 1x10⁵ UFF. La excreción de virus en heces fue monitoreada diariamente por ELISA durante 8 días tal y como se describe en el siguiente numeral.

6.11.4 Detección de rotavirus cepa EDIM por ELISA en heces de ratones

Las muestras de heces de ratones fueron incubadas toda la noche a 4°C en buffer de disociación (Buffer TNC, suero fetal bovino (SFB) 5%, Tween-20 0.05% y azida de sodio 0.4 mM), se mezclaron posteriormente y se centrifugaron a 13,000 rpm, recuperando el sobrenadante. La carga viral del sobrenadante fue evaluada mediante ELISA en placas de 96 pozos tipo Costar high-binding (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA): Se dejaron incubar 50 µL de suero hiperinmune de cabra “Cabrax” a una dilución 1:5,000. Las placas se incubaron toda la noche a 4°C y se bloquearon con una solución al 5% de leche descremada en buffer TNC, a temperatura ambiente, por dos horas. Los sobrenadantes de la dilución de heces se agregaron a los pozos y se incubaron por 2 h a 37°C. Las placas fueron lavadas cuatro veces con solución de lavado (Buffer TNC, Tween 20 0.2%), y se adicionó una dilución 1:2,000 de un suero hiperinmune de conejo antirotavirus RRV, incubándolo por 1 h a 37°C. Después de cuatro lavados, se agregó un anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo acoplado a fosfatasa alcalina (Zymed, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) y se incubó por 1 h a 37°C. Finalmente, se agregó el sustrato PNPP y las placas se dejaron reaccionar entre 45 min y 1 h a 37°C. La absorbancia fue medida a 405 nm en un lector de placas (Labsystem, Original Multiskan). Todos los anticuerpos utilizados para este ensayo fueron cordialmente suministrados por el Dr. Fernando Esquivel (Facultad de medicina, UAEM).

CAPÍTULO 7

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Amplificación de genes de rotavirus bovino

7.1.1 Gen de VP2

Se realizaron infecciones de células de insecto High Five[®] tal y como se describe en el numeral 6.1. Los cultivos se cosecharon a las 48 horas post infección (hpi) y se extrajo el RNA_T. En la figura 7.1 se muestran los resultados obtenidos:

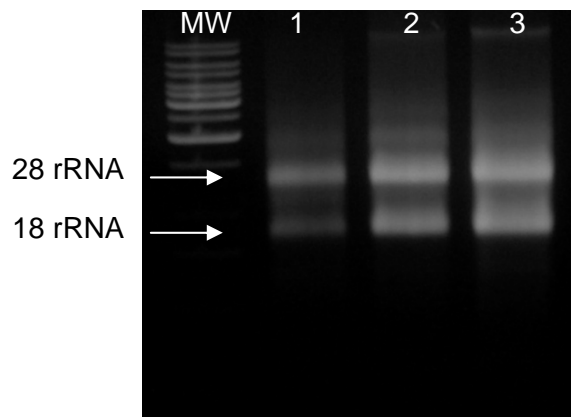


Figura 7.1 RNA total extraído de cultivos de células H5 infectados con BacVP2. **MW:** Marcador de peso molecular Generuler 1 Kb (Fermentas, Inc). RNA total de la infección con BacVP2 **1:** 24 hpi. **2:** 48 hpi. **3:** 60 hpi. Gel de agarosa al 1% visualizado con luz UV a 254 nm

Posteriormente se realizaron las reacciones de retrotranscripción y se estandarizaron las temperaturas y tiempos de la reacción de PCR. En la figura 7.2, se muestran las amplificaciones del gen de VP2 (2660 pb).

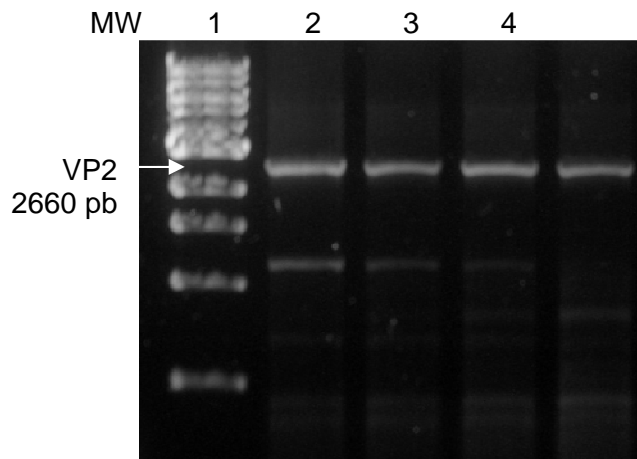


Figura 7.2 Reacciones de PCR de gradiente para VP2 **MW:** Marcador de peso molecular 1 Kb (New England Biolabs). **1:** Temp de alineamiento: 55°C. **2:** 58°C. **3:** 66°C **4:** 68°C. Gel de agarosa al 1% visualizado con luz UV a 254 nm

7.1.2 Gen de VP6

Se extrajo el RNA viral de la vacuna Scourguard® (Pfizer) como se explicó en el numeral 6.1.2. En la figura 7.3, se muestran los resultados obtenidos para las reacciones de PCR de VP6 cepa NCDV extraída de la vacuna:

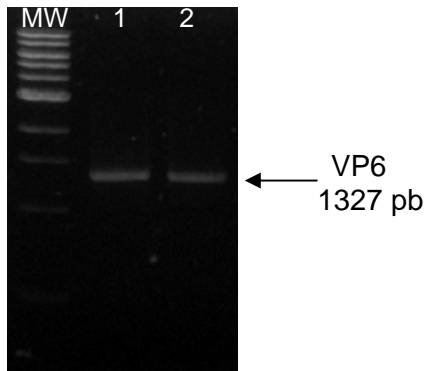


Figura 7.3 Reacción de PCR para VP6 **MW:** Marcador de peso molecular 1 Kb (New England Biolabs). **1:** PCR con 1 μ L de templado (reacción de RT) **2:** PCR con 2 μ L de templado. Gel de agarosa al 1% visualizado con luz UV a 254 nm

Se observa para esta reacción una única banda. Esta reacción de PCR fue utilizada directamente para la reacción de TOPO *Cloning*.

7.1.3 Genes de VP7

Las construcciones de VP7 se encontraban en un vector PCR8TOPO (para los genotipos G6 y G10 aislados de las muestras de campo [3]). Hubo necesidad de amplificar el gen por PCR y clonarlo utilizando el vector PCR2.1TOPO. En la figura 7.4 se muestran los PCR de colonias de algunas clonas obtenidas:

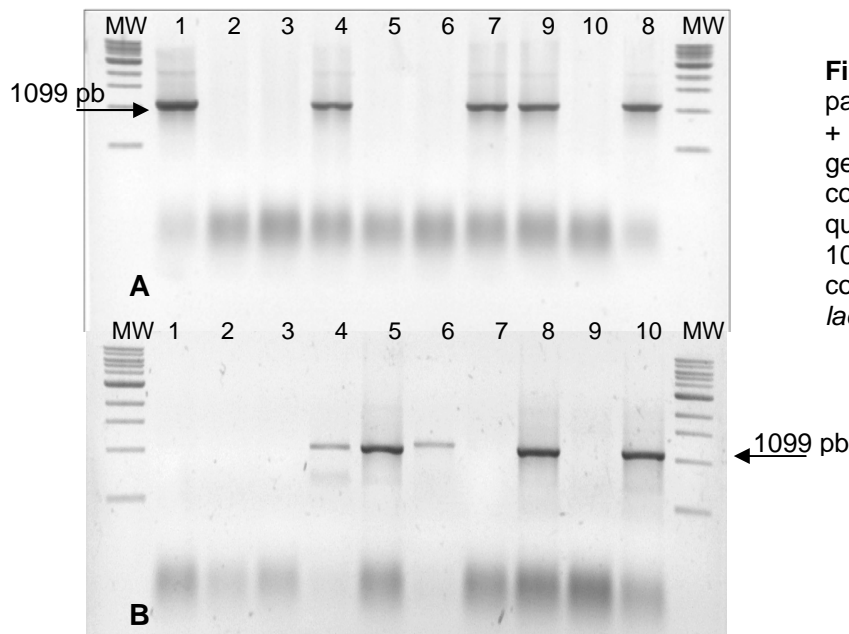


Figura 7.4 PCR de colonias para las construcciones pCR2.1 + VP7. **A.** Construcciones con el genotipo G6 **B.** Construcciones con el genotipo G10. Las clonas que expresaron el amplicón de 1099 pb tienen la orientación correcta en el vector. MW: DNA ladder 1 Kb de fermentas

7.2 Clonación en vectores para levadura

Se escogieron diferentes tipos de plásmidos episomales y centroméricos, con promotores constitutivos (PMA1, PGK1, TEF1) y regulables (CUP1) para evaluar su influencia sobre la producción de proteínas recombinantes. A continuación se detallan las construcciones obtenidas:

7.2.1 Vectores de la familia pRS y pSAL

VP2 en pRS2

El gen de VP2 de la cepa RF, clonado inicialmente en pJet1 fue subclonado en el vector pRS2. En la figura 7.5 se observa un gel de agarosa al 1% con reacciones de PCR de colonias de *E. coli* producto de la ligación de VP2 en pRS2. El tamaño del gen clonado fue de 2660 pb y se utilizaron los mismos oligos para corroborar la presencia en las nuevas construcciones:

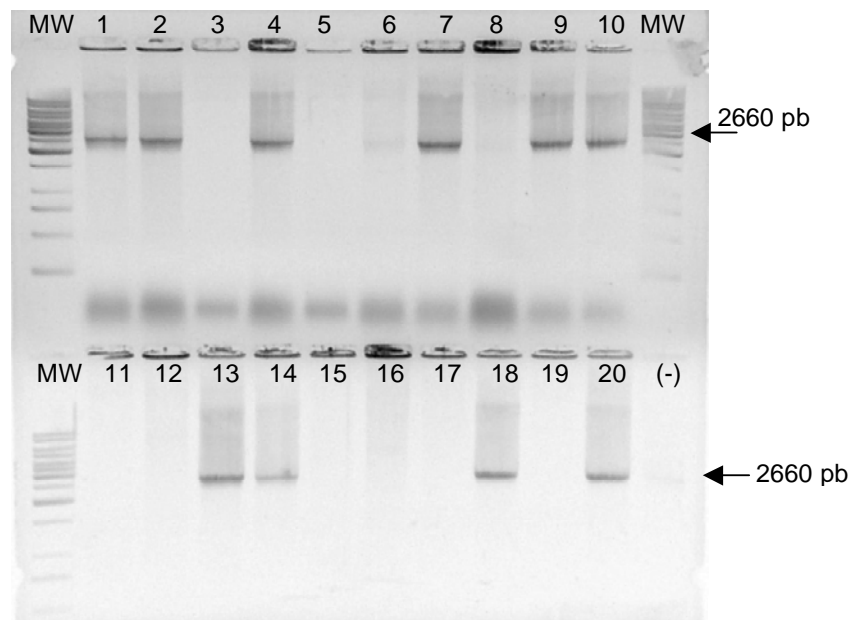


Figura 7.5 PCR de colonias de 20 clonas obtenidas de la ligación pRS2 VP2. El producto obtenido corresponde a 2660 pb.

VP6 en pRS7

El gen de VP6 fue subclonado en el vector pRS7 en los sitios XhoI/SacI mediante digestión con enzimas de restricción y posterior ligación con la enzima T4 DNA ligasa

(Fermentas, Inc, Burlington, ON, Canadá). Luego de la clonación, se transformaron células ultracompetentes de *E. coli* Mach1™-T1^R (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA). Las colonias obtenidas fueron nuevamente seleccionadas mediante PCR de colonia. A continuación en la figura 7.6, se observa el gel de agarosa de 10 colonias escogidas:

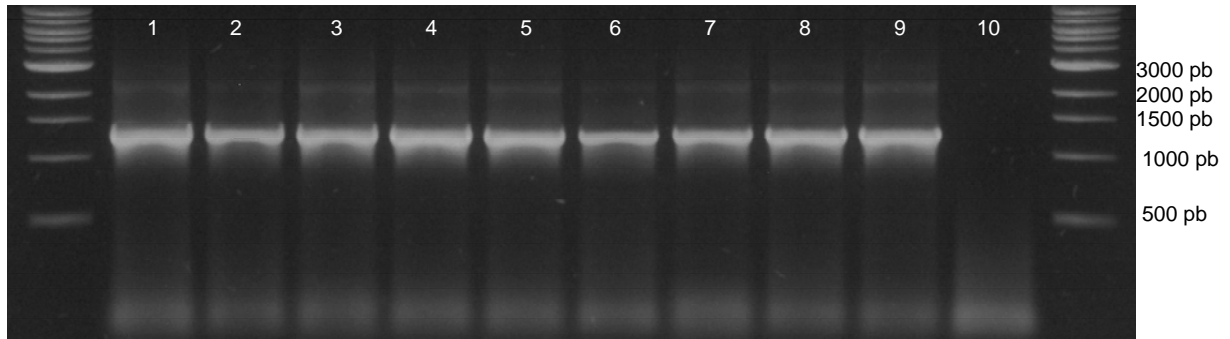


Figura 7.6 Amplificación por PCR de colonias del gen de VP6 insertado en el vector pRS7. Solamente la clona 10 no poseía el inserto de VP6 de la cepa de NCDV

VP7 en pSAL4 y pSAL5

Para clonar VP7 en levaduras, se utilizaron los vectores pSAL5 y pSAL4 que contienen el promotor regulable CUP1 y genes para complementar las auxotrofías en histidina (HIS3) y uracilo (URA3). El gen se clonó en los sitios XhoI y SacI de ambos plásmidos. Las clonas obtenidas se verificaron por PCR y patrón de restricción. En la figura 7.7, se observan los resultados de PCR de colonias de algunas clonas obtenidas del producto de ligación:

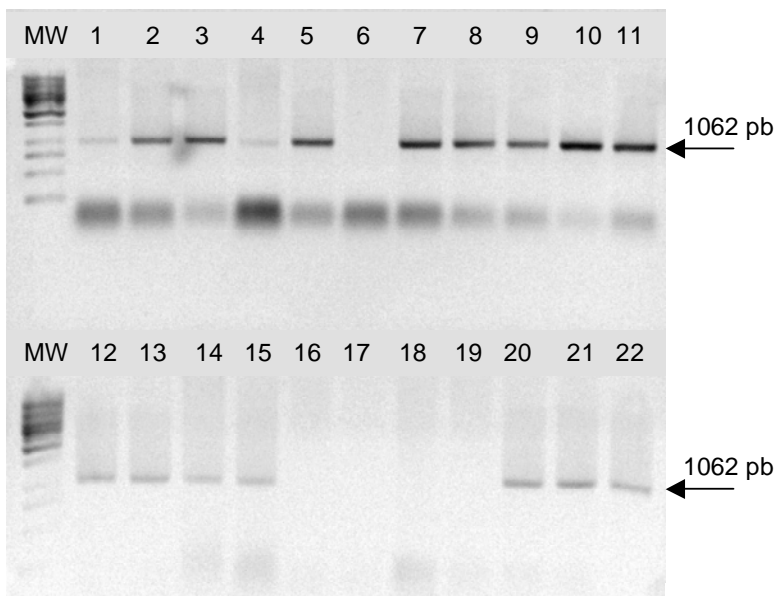


Figura 7.7. PCR de colonias de diferentes construcciones de VP7 realizadas en *E. coli*. MW: Generuler DNA 1 Kb ladder (Fermentas, Inc).
 Carriles 1-7: Construcción pSal5G10.
 Carriles 8-14: Construcción pSal4G10.
 Carriles 15-21: Construcción pSal4G6.
 Carril 22: Control positivo para reacción de PCR, usando como templado el vector PCR2.1VP7G10

Se utilizó EcoRI, ya que los genes de G6 y G10 tienen patrones de restricción diferentes y característicos que fueron determinados en un estudio previo [3]. El genotipo G6 aislado al ser digerido con EcoRI dio como resultado un fragmento de 815 pb y otro de 214 pb. El genotipo G10 presenta una banda de 961 pb y una de 80 pb (no visible). Además, en las construcciones realizadas, se observó una banda de 6140 pb que corresponde al vector sin el inserto. En la figura 7.8 se observa el patrón de restricción obtenido usando EcoRI para cuatro clonas seleccionadas:

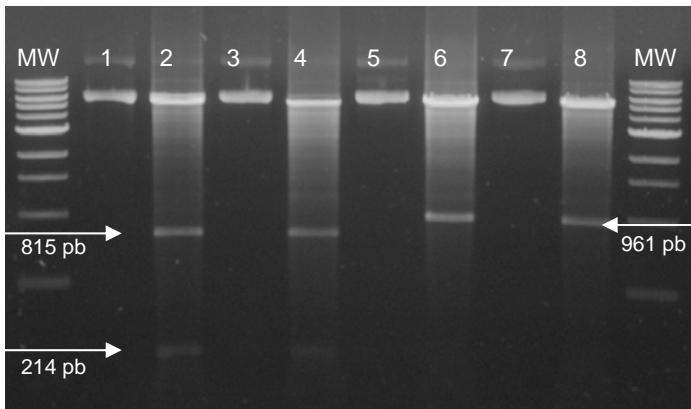


Figura 7.8 Patrón de restricción de 4 clonas de VP7 con EcoRI. **1 y 3:** Plásmidos sin digerir de clonas del genotipo G6. **2 y 4:** Plásmidos digeridos con EcoRI para el genotipo G6. **5 y 7:** Plásmidos sin digerir de los genotipos G10. **6 y 8:** Plásmidos digeridos con EcoRI para el genotipo G10. **MW:** DNA ladder 1 Kb de fermentas

El DNA plasmídico de estas clonas se utilizó para transformar levaduras, siguiendo el procedimiento de transformación con acetato de litio.

7.2.2 Construcciones en el vector pSP-GM2

Las construcciones de estos vectores se esquematizan en la figura 6.1 de materiales y métodos. A continuación se detallan los resultados obtenidos:

pWR Δ 2

Para obtener pWR Δ 2 se amplificó por PCR el gen con el nuevo sitio de unión a ribosoma, usando los oligos WR004 y WR005 y clonando en el plásmido pSP-GM2 en los sitios NotI/SpeI. Para comprobar que se había clonado correctamente el gen, se realizó PCR de colonia de algunas de las clonas obtenidas, utilizando los oligos DCA002 y 3'INTVP2 (uno se encuentra dentro del gen y otro en el plásmido). El producto de PCR esperado era ~1600pb. A continuación se muestra en la figura 7.9, el gel de agarosa del producto de PCR de 6 colonias obtenidas y dos controles negativos (colonias WT):

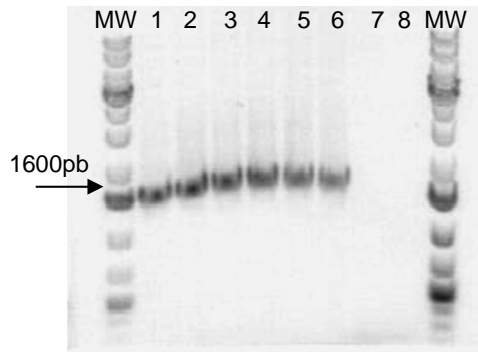


Figura 7.9. PCR de colonias para verificación de la construcción pWR Δ 2. **Carriles 1-6:** PCR de colonias con el plásmido pWR Δ 2, **Carriles 7 y 8:** PCR de colonias de *E. coli* DH5 α sin plásmido. **MW:** Generuler 1KB plus DNA (fermentas)

pWR6

Para pWR6 se clonó el gen de VP6 (NCDV) usando los sitios de restricción XhoI/KpnI en el plásmido pSP-GM2. A las clonas obtenidas se les comprobó la inserción correcta del gen mediante PCR de colonias, usando los oligos para VP6 y patrones con enzimas de restricción. En la figura 7.10A y B, se observa que las colonias 14 y 18 contenían el gen y el patrón de restricción esperado.

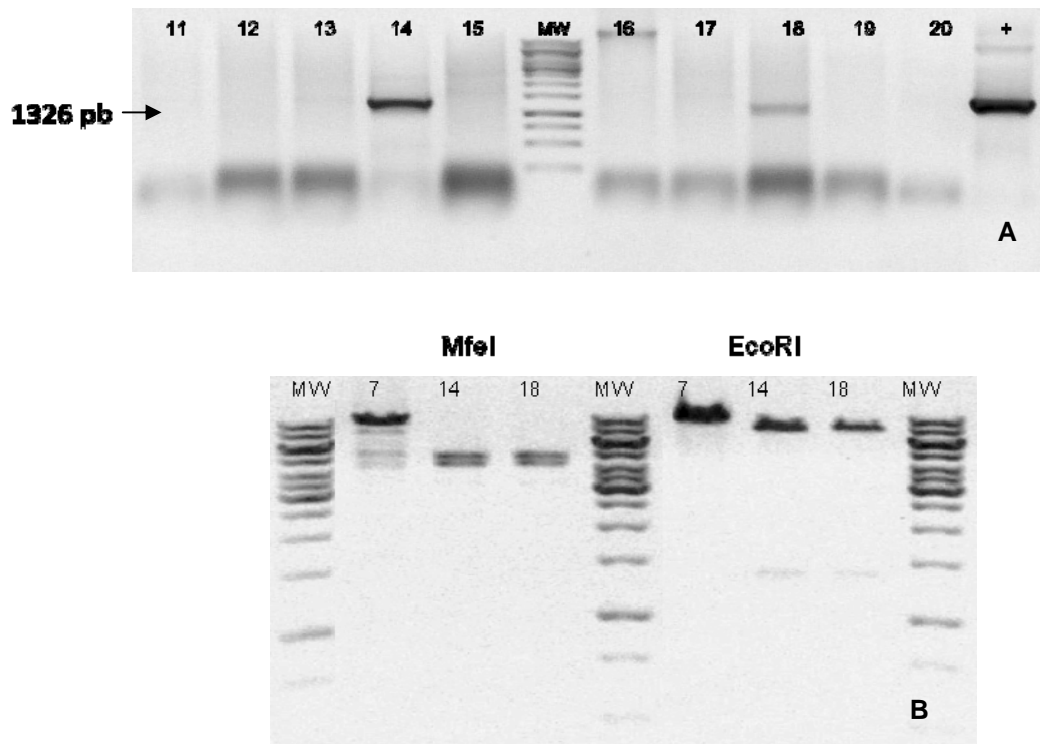


Figura 7.10. Verificación del plásmido pWR6. **A.** PCR de colonias de 10 clonas seleccionadas. **B.** Patrón de restricción de las clonas 14 y 18 (positivas) y 7 (negativa), mostrando perfil esperado para las enzimas MfeI y EcoRI.

pWR7

De igual manera, para la construcción de pWR7, se utilizaron los oligos KK007 y KK013, así como las enzimas PstI y EcoRV para corroborar la correcta clonación. En la figura 7.11A, se observa la amplificación del gen esperado (1959 pb) en nueve colonias. Se escogieron tres colonias (Figura 7.11B) para verificar la construcción mediante patrón de restricción con las enzimas PstI y EcoRV.

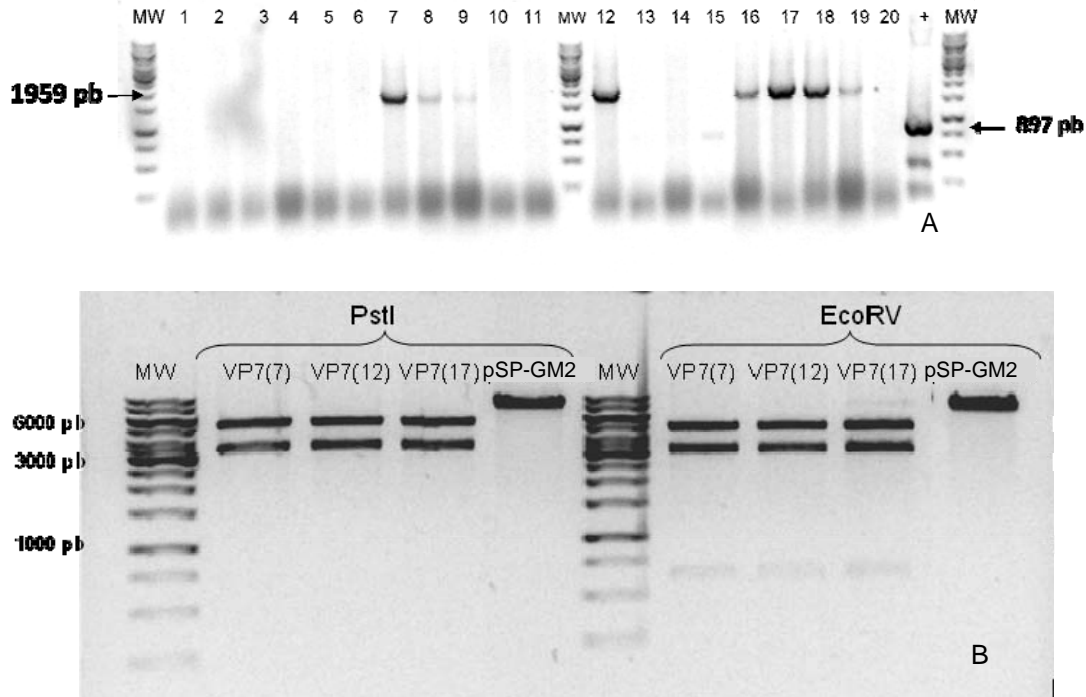


Figura 7.11. Verificación del plásmido pWR7. **A.** PCR de colonias de 20 clonas seleccionadas, amplificación del *cassette* completo incluyendo el gen de VP7 es de 1959 pb, el *cassette* vacío es de 897pb, se usó el plásmido vacío como control positivo de reacción de PCR. **B.** Patrón de restricción de las clonas 7, 12 y 17 (positivas) y plásmido vacío, mostrando perfil esperado para las enzimas PstI y EcoRV.

pWR26

Para la construcción del plásmido pWR26, se clonó el gen de VP6 sobre el plásmido pWR Δ 2, en el sitio XhoI/KpnI. En la figura 7.12 se muestra la comprobación mediante PCR de colonias, usando los oligos KK007 y KK013. Un producto de PCR de 2223 pb corresponde al *cassette* que incluye el gen de VP6, un producto de 897 pb corresponde al *cassette* vacío.

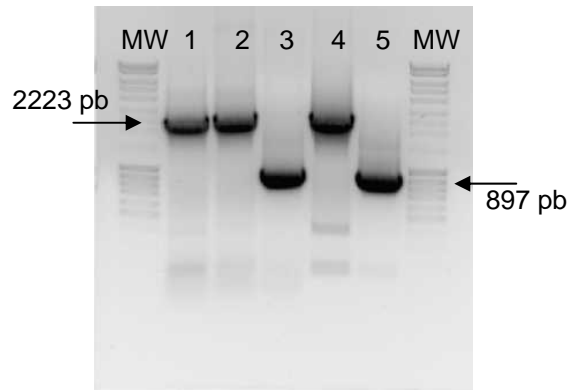


Figura 7.12. Verificación del plásmido pWR26. **Carriles 1-3:** PCR de colonias de 3 clonas seleccionadas, muestra 2 clonas positivas y una negativa. **Carril 4:** PCR usando como templado el plásmido pWR6 (+). **Carril 5:** PCR usando como templado el plásmido pSP-GM2 vacío (-).

pWR267

Finalmente, para construir el plásmido pWR267 se usó como base el plásmido pWR26 y se amplificó por PCR el *cassette* completo TEF1-VP7-CYC1, usando los oligos WR001 y WR002 que además contienen secuencias para clonación posterior en el sitio *Ascl*. Para verificar la inserción del *cassette* y su correcta orientación, se usaron los oligos Bov9Com3 y WR003 y se realizaron PCR de colonias de las clonas resultantes. En la figura 7.13 se muestra la comprobación de dichas construcciones. El producto de PCR esperado corresponde a 1646 pb.

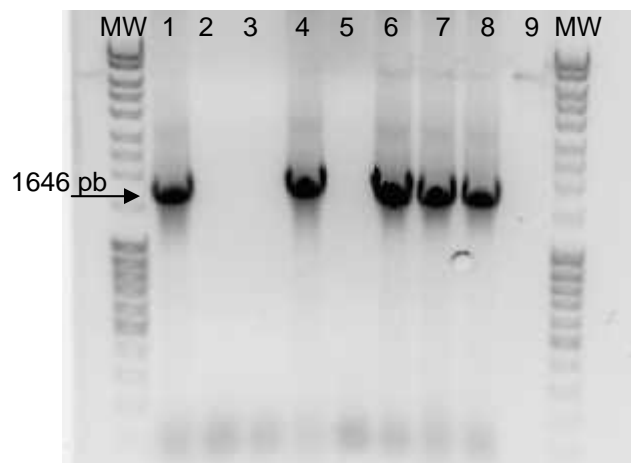


Figura 7.13 Verificación del plásmido pWR267. **Carriles 1-8:** PCR de colonias de 8 clonas seleccionadas. **Carril 9:** Control negativo de reacción de PCR. Se observa que las clonas 1,4,6,7 y 8 contienen el *cassette* en la posición correcta.

Todos estos plásmidos construidos fueron transformados en diferentes cepas de levaduras, utilizando el método de transformación con acetato de litio [58]. Luego, las clonas escogidas fueron preservadas en glicerol y almacenadas a -80C.

7.3 Expresión de proteínas heterólogas

La expresión de proteínas heterólogas para las construcciones individuales se siguió por Western Blot, ELISA y/o inmunofluorescencia. La expresión de VP6 pudo seguirse por cualquiera de estos métodos, pero para el caso de VP2 y VP7, la expresión de proteínas sólo pudo evidenciarse en los primeros cultivos mediante inmunofluorescencia, utilizando anticuerpos monoclonales que reconocen epítopes conformacionales. A continuación (Figura 7.14), se muestran los resultados obtenidos para las construcciones derivadas de la cepa W3031a.

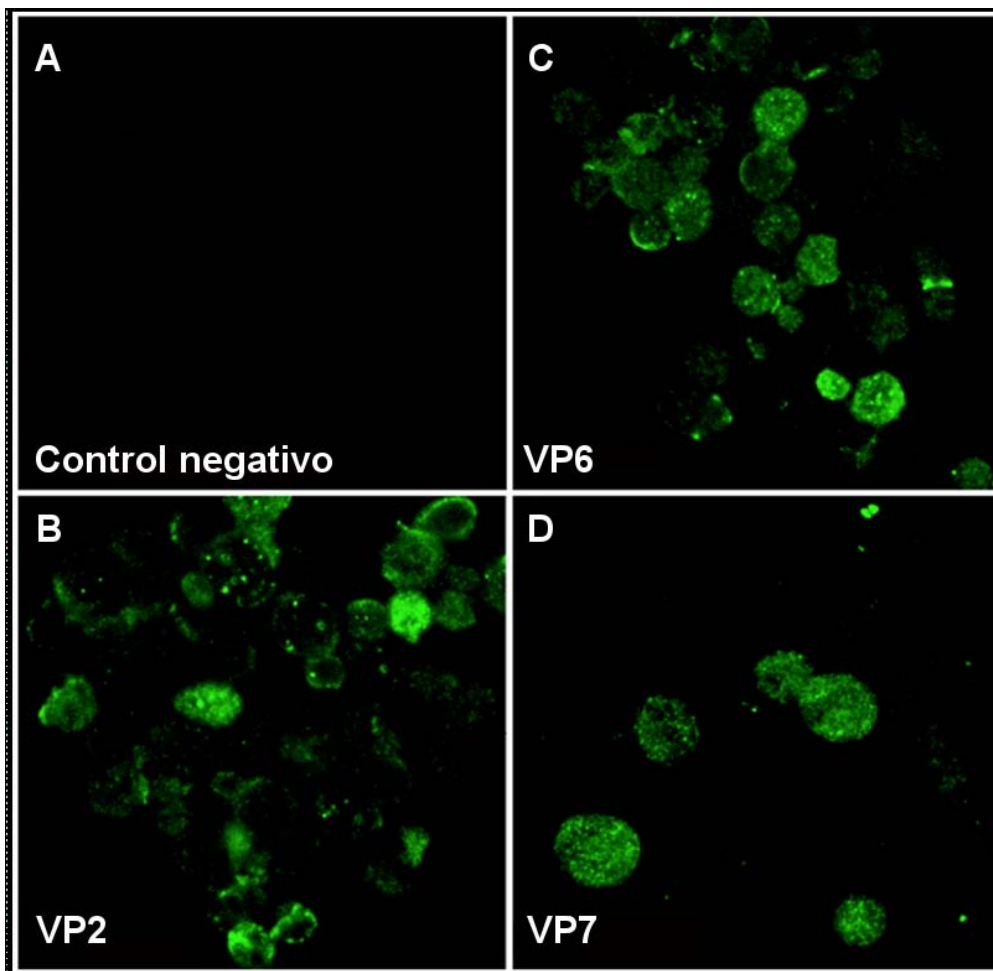


Figura 7.14 Inmunodetección de proteínas de rotavirus en cultivos de S.c W3031a que expresan individualmente VP2, VP6 ó VP7. **Panel A:** Control negativo. Cultivo de S.c W3031a sin transformar. **Panel B.** Cultivo de S.c W.L-2. **Panel C.** Cultivo de S.c W.T-6. **Panel D.** Cultivo de S.c W.U-7. Se usaron anticuerpos monoclonales para detectar cada proteína: 3A8, 255 e IC3 para VP2, VP6 and VP7, respectivamente. Se utilizó un anticuerpo de cabra anti-ratón acoplado a Alexa 488 como anticuerpo secundario (señal en verde).

Mediante Western Blot y ELISA se pudieron seguir las cinéticas de producción de los cultivos de PJ.T-6, PD.U-6, PJ.U-6 y W.T-6. En la figura 7.15 se muestra una cinética de producción de VP6 en la cepa PJ.T-6.

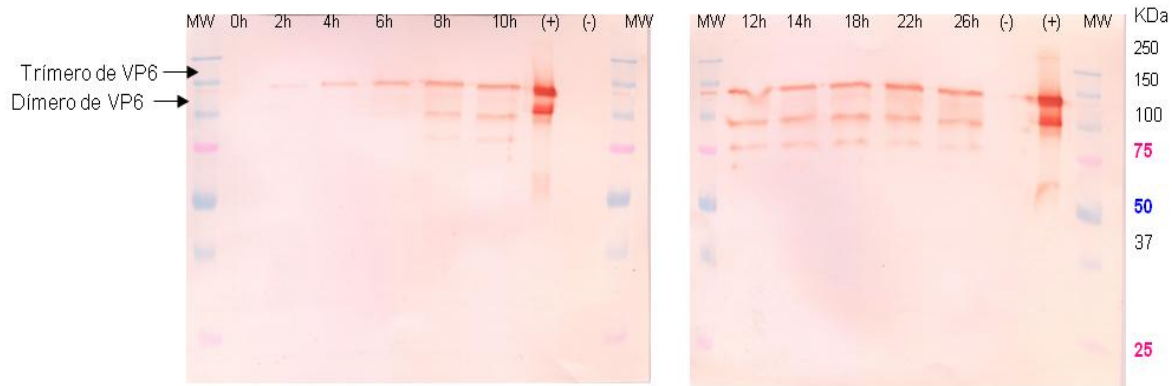


Figura 7.15 Western blot de la cinética de cultivo de la cepa PJ.T-6. Condiciones no reductoras. Anticuerpo primario α -VP6 255/6 (1:5000), Anticuerpo secundario α -ratón HRP (1:2000). Control positivo: 240 ng de VP6 producida en SCI-BV. Control negativo: Extracto celular de S.c PD.U-C

La posibilidad de cuantificar la proteína VP6 en los cultivos hizo que los desarrollos de optimización de medio de cultivo y estrategia de alimentación utilizaran como variables de respuesta a analizar, la medición de VP6 por ELISA. En el numeral 7.4 se detallan los resultados obtenidos.

7.4 Diseño de experimentos para suplementación del medio de cultivo CSM

La desventaja más tangible del cultivo en medio sintético completo radica en los bajos valores de biomasa máxima y de proteína heteróloga alcanzados, si se comparan con las productividades de los cultivos en medio rico (hasta cinco veces menos, en condiciones por lote). Esto se debe a que los medios complejos poseen precursores biosintéticos que pueden ser canalizados directamente hacia las rutas anabólicas. Por otra parte, cuando es necesario trabajar con medios químicamente definidos para mantener la presión de selección del cultivo, una estrategia para el mejoramiento de la expresión heteróloga de proteínas es mediante la adición de algunos precursores al medio de cultivo. Algunos estudios muestran un incremento sustancial en la producción de proteína heteróloga al adicionar exceso de algunos aminoácidos como Ala, Arg, Asn, Glu, Gln y Gly, así como la adición de succinato al medio de cultivo [62]. Por lo tanto, se realizaron dos diseños experimentales a nivel matraz para el incremento de la proteína heteróloga:

7.4.1 Diseño experimental 2^{4-1}

En este estudio se analizó el efecto de algunos aminoácidos, nucleótidos y precursores de TCA sobre la producción de biomasa, el consumo de sustrato y la formación de producto. Se estableció un primer diseño experimental fraccional a dos niveles con cuatro factores 2^{4-1} , el cual fue realizado a nivel matraz. Los factores analizados fueron: Concentración de leucina, glutamato y succinato, así como el tipo de cepa de levaduras (W.T-6 o P.J.T-6). Se analizaron dos concentraciones de cada suplemento, de acuerdo a valores reportados previamente en la literatura [62, 63] y las variables de respuesta analizadas fueron la concentración de biomasa y de proteína VP6 producida. En la tabla 7.1 se muestran las condiciones de los 8 experimentos:

Tabla 7.1 Condiciones del diseño experimental 2^{4-1}

Experimento	Leucina mM	Glutamato mM	Succinato mM	Cepa
1	0.45	20	50	W.T-6
2	0.90	20	50	P.J.T-6
3	0.45	40	50	P.J.T-6
4	0.90	40	50	W.T-6
5	0.45	20	100	P.J.T-6
6	0.90	20	100	W.T-6
7	0.45	40	100	W.T-6
8	0.90	40	100	P.J.T-6

Posteriormente, se realizó el análisis de los resultados empleando un análisis de varianza (ANOVA), usando para ello el *software* Design-Expert 5 (Stat-ease, Inc. Minneapolis, MN, USA). Los resultados mostraron una dependencia entre la producción de proteína VP6 y la cepa utilizada. Así pues, la ecuación final en términos de factores codificados quedó de la siguiente forma:

$$VP6 (\mu\text{g/L}) = +295.96 + 101.56 * D \quad (3)$$

Donde D es: para la cepa W.T-6 = -1 y para la cepa P.J.T-6 = 1.

De igual forma, los resultados mostraron que las concentraciones de glutamato, succinato y leucina, a pesar de que incrementaron en algunos experimentos la producción de VP6,

no tuvieron una influencia estadísticamente significativa sobre la concentración de biomasa o de proteína VP6. En la figura 7.16 se muestran los valores de VP6 obtenidos por ELISA y Western blot:

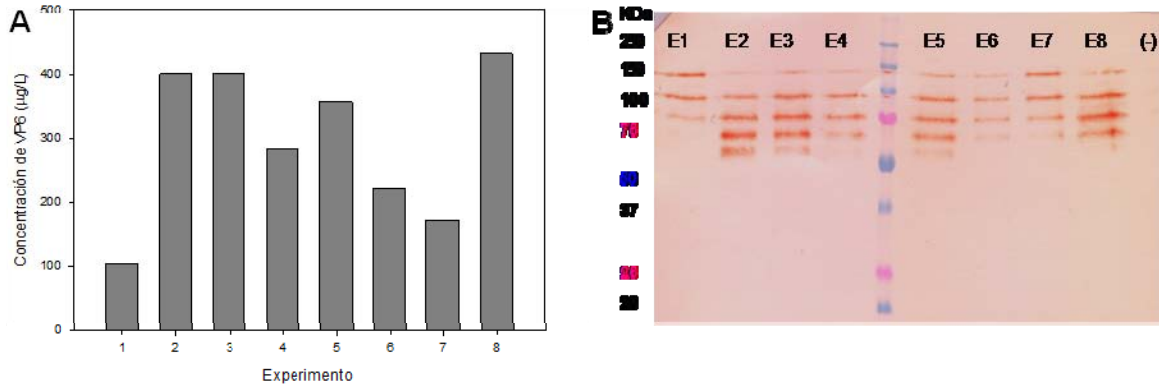


Figura 7.16 VP6 determinada por **(A)** ELISA y **(B)** Western blot de extractos celulares de los experimentos 1 a 8 (E1-E8), analizados en condiciones no reductoras. Anticuerpo primario Suero de conejo α -Rotavirus NCDV (1:3000), Anticuerpo secundario α -conejo HRP (1:2000).

La cepa PJ.T-6 fue utilizada para el siguiente diseño de experimentos.

7.4.2 Diseño experimental 2^3 para la cepa PJ.T-6

Se estableció a nivel matraz un diseño 2^3 utilizando distintas concentraciones de leucina, glutamato y succinato en el medio CSM para la cepa de *S. cerevisiae* PJ.T-6. En la tabla 7.2 se listan las condiciones de los experimentos realizados.

Tabla 7.2. Diseño experimental de tres variables a dos niveles

Experimento	Leucina mM	Glutamato mM	Succinato mM
9	0.90	0	0
10	1.80	0	0
11	0.90	20	0
12	1.80	20	0
13	0.90	0	50
14	1.80	0	50
15	0.90	20	50
16	1.80	20	50

Los valores de biomasa y consumo de sustrato se consignan en el anexo A. La proteína heteróloga fue cuantificada al final del cultivo (28 h) por ELISA. Los resultados se muestran en la figura 7.17.

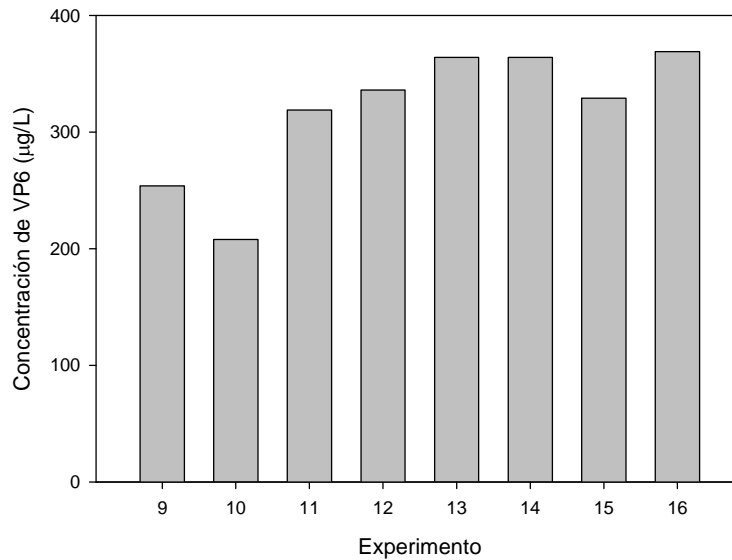


Figura 7.17 Concentración de VP6 determinada por ELISA para extractos celulares del diseño experimental 2^3

Los parámetros cinéticos y estequiométricos de los cultivos se consignan en la tabla 7.3.

Tabla 7.3. Parámetros cinéticos y estequiométricos del diseño experimental 2^3

	Exp # 9	Exp # 10	Exp # 11	Exp # 12	Exp # 13	Exp # 14	Exp # 15	Exp # 16
μ_{\max} h ⁻¹	0.292	0.273	0.262	0.299	0.327	0.312	0.292	0.307
$Y_{x/s}$ (gDWC/g glucosa)	0.120	0.093	0.104	0.106	0.120	0.133	0.104	0.128
Tiempo de duplicación T_D (h)	2.36	2.53	2.65	2.31	2.12	2.22	2.37	2.25
VP6 (mg/L)	0.254	0.208	0.319	0.336	0.364	0.364	0.329	0.369
$Y_{p/x}$ (mg VP6/ g biomasa)	0.089	0.093	0.133	0.14	0.14	0.133	0.142	0.148
$Y_{p/s}$ (mg VP6/g glucosa)	0.0107	0.0087	0.0149	0.0150	0.0169	0.0178	0.0148	0.0190

Se realizó un ANOVA utilizando como variables de respuesta cada uno de los valores de la tabla 7.3. Los resultados mostraron que no existía una diferencia estadísticamente significativa entre los experimentos. Las condiciones del experimento 16 fueron utilizadas para suplementar los cultivos por lote alimentado que se presentarán en el numeral 7.6.2

7.5. Análisis transcriptómico de cepas de *S. cerevisiae* productoras de VP6

Para analizar si el fondo genético era un factor determinante en la síntesis de proteína heteróloga y si las cepas de nuestro estudio contaban con características deseables para la producción de proteínas heterólogas, se desarrolló un estudio en el grupo de biología de sistemas del Dr. Jens Nielsen en Chalmers University of Technology (Suecia). Se realizó un análisis transcriptómico de cepas productoras de VP6 y se compararon con sus parentales para evidenciar la influencia del fondo genético con la producción de proteína heteróloga. Los resultados de estos estudios evidenciaron que las cepas que expresaban VP6 mostraban cambios en los niveles de expresión de gran cantidad de los genes asociados al metabolismo de azufre, desde los pasos iniciales de entrada celular hasta las rutas de biosíntesis de metionina, cisteína y glutatión (Ver Anexo C).

La influencia de la producción de VP6 sobre la disminución de la expresión de genes del metabolismo de azufre parece estar asociada a la disminución de la división celular, mostrado en valores absolutos como una disminución en el tiempo de duplicación en comparación con las cepas que no expresan la proteína heteróloga y que ha sido reportado como un determinante en la regulación transcripcional del metabolismo de azufre [64-66].

7.6 Estrategias moleculares para la producción simultánea de las tres proteínas de rotavirus (VP2, VP6 y VP7)

7.6.1 Selección de plásmidos y cepas

La producción de PPV de rotavirus de triple capa (tIRLP) requiere la expresión simultánea de cada una de las proteínas estructurales VP2, VP6 y VP7, en la misma célula. Esta

expresión puede lograrse mediante el uso de tres plásmidos episomales o centroméricos que contengan un gen por plásmido y que complementen una de las auxotrofías de la levadura, o por la construcción de un único plásmido que contenga los tres genes y una única auxotrofia. Para evidenciar cual de las dos estrategias era mejor, se construyó una cepa que contenía el gen de VP6 en un plásmido centromérico (Cepa W.T-6) y otra que contenía 3 plásmidos vacíos (W.TLU-C), uno centromérico y dos episomales (ver tabla 6.9). En la tabla 7.4 se muestran las velocidades específicas de crecimiento máximas de las dos cepas y su rendimiento biomasa sustrato ($Y_{x/s}$) para cultivos por lote en matraz agitado, tal y como se indica en materiales y métodos. La presencia de los tres plásmidos en la misma célula disminuyó la velocidad de crecimiento del cultivo en un 36% con respecto a la cepa con un único plásmido, pero no influyó significativamente sobre los rendimientos $Y_{x/s}$ de cada uno de las cepas. La cepa W.TLU-C alcanzó la máxima concentración de biomasa 12 h después que la cepa W.T-6. Estos resultados muestran que el uso de los tres plásmidos incrementó la carga metabólica de la levadura, probablemente debido a la necesidad de complementar las tres auxotrofías o a la carga asociada a la producción de múltiples copias de cada uno de los plásmidos. Una carga metabólica mayor desvía las fuentes de carbono y nitrógeno que se utilizarían para la producción de proteína heteróloga y se espera como resultado una disminución en los rendimientos de proteína heteróloga.

Tabla 7.4. Parámetros cinéticos y estequiométricos de las cepas con uno (W.T-6) o tres plásmidos (W.TLU-C) en la misma célula.

Parámetro	Cepa	
	W.T-6	W.TLU-C
μ_{max} (h^{-1})	0.250 \pm 0.010	0.159 \pm 0.011
TD (h)	2.77 \pm 0.12	4.33 \pm 0.30
$Y_{x/s}$ (g DCW/ g glucosa)	0.133 \pm 0.001	0.147 \pm 0.002
Tiempo de cultivo (h)	24	36

Los resultados mostraron que el uso de un único plásmido episomal con tres promotores independientes mejora las velocidades específicas máximas de crecimiento de las cepas, debido a una menor carga metabólica asociada al mantenimiento de la presión de selección en un medio completamente definido, en comparación con el uso de tres plásmidos, cada uno con un gen. El uso de un único plásmido para la producción de las

tres proteínas de rotavirus tiene varias ventajas: a) El número de copias es el mismo para cada gen, b) se reduce la demanda de ácidos nucleicos, y c) se requiere suplementar sólo una auxotrofia para mantener la presión de selección.

Por todo lo anterior, se redujo el número de plásmidos y marcadores de auxotrofia empleados. Así, se introdujeron uno, dos o tres genes de rotavirus en un único plásmido multicopia. Los promotores constitutivos PGK1 y TEF1 fueron utilizados para clonar los tres genes en una misma célula (Ver figura 6.1). Se espera que los genes clonados bajo estos promotores sean expresados constitutivamente durante todo el cultivo y que sus niveles de expresión sean independientes de la fuente de carbono o nitrógeno empleada por la célula [57]. Para identificar las mejores productoras de proteína recombinante, se evaluaron cuatro cepas diferentes y dos variantes de plásmido (YCp ó YEp) que solo contenían el gen de VP6. Estas cepas fueron evaluadas en cultivos por lote usando el medio CSM sin suplementos. Los parámetros cinéticos y estequiométricos se resumen en la tabla 7.5. Las cinéticas de concentración de biomasa y producción de VP6 se muestran en la figura 7.18. Los datos completos de biomasa, sustrato y metabolitos de estos cultivos se encuentran consignados en el Anexo B1.

Tabla 7.5. Parámetros cinéticos y estequiométricos de cultivos por lote de cepas productoras de VP6

Parámetro	Cepa			
	P.J.T-6	W.T-6	CEN.U-6	PD.U-6
μ_{\max} (h^{-1})	0.259 ± 0.005	0.276 ± 0.019	0.251 ± 0.035	0.299 ± 0.019
VP6 ($\mu g/L$)	214 ± 21	154 ± 23	80 ± 1	181 ± 37
$Y_{x/s}$ (g DCW/g glucosa)	0.107 ± 0.002	0.105 ± 0.002	0.088 ± 0.003	0.160 ± 0.001
$Y_{p/x}$ (μg VP6/g DCW)	99.42 ± 7.95	73.35 ± 9.61	45.47 ± 2.76	56.13 ± 11.46
$Y_{p/s}$ (μg VP6/g glucosa)	10.68 ± 1.05	7.74 ± 1.16	4.02 ± 0.40	9.03 ± 1.88
Productividad específica (μg VP6/gDCW·h)	4.52 ± 0.36	2.82 ± 0.37	2.84 ± 0.17	2.14 ± 0.44
Productividad volumétrica (μg VP6/L·h)	9.70 ± 0.95	5.96 ± 0.89	5.02 ± 0.50	6.88 ± 1.43
α (μg VP6/g DCW)*	22.98	22.32	3.31	23.1
β (μg VP6/g DCW·h)*	4.44	2.82	1.2	2.14

* Parámetros del modelo de formación de producto asociado al crecimiento desarrollado por Luedeking y Piret [67]

La cepa con la velocidad de crecimiento mayor (PD.U-6) empezó a crecer antes que las demás cepas y alcanzó la concentración celular más alta. En contraste, el crecimiento de la cepa CEN.U-6 se retrasó y la concentración celular obtenida fue la menor. La cepa PJ.T-6 produjo la concentración más alta de VP6, que correspondió a 2.7 veces la concentración de VP6 obtenida por la cepa CEN.U-6..

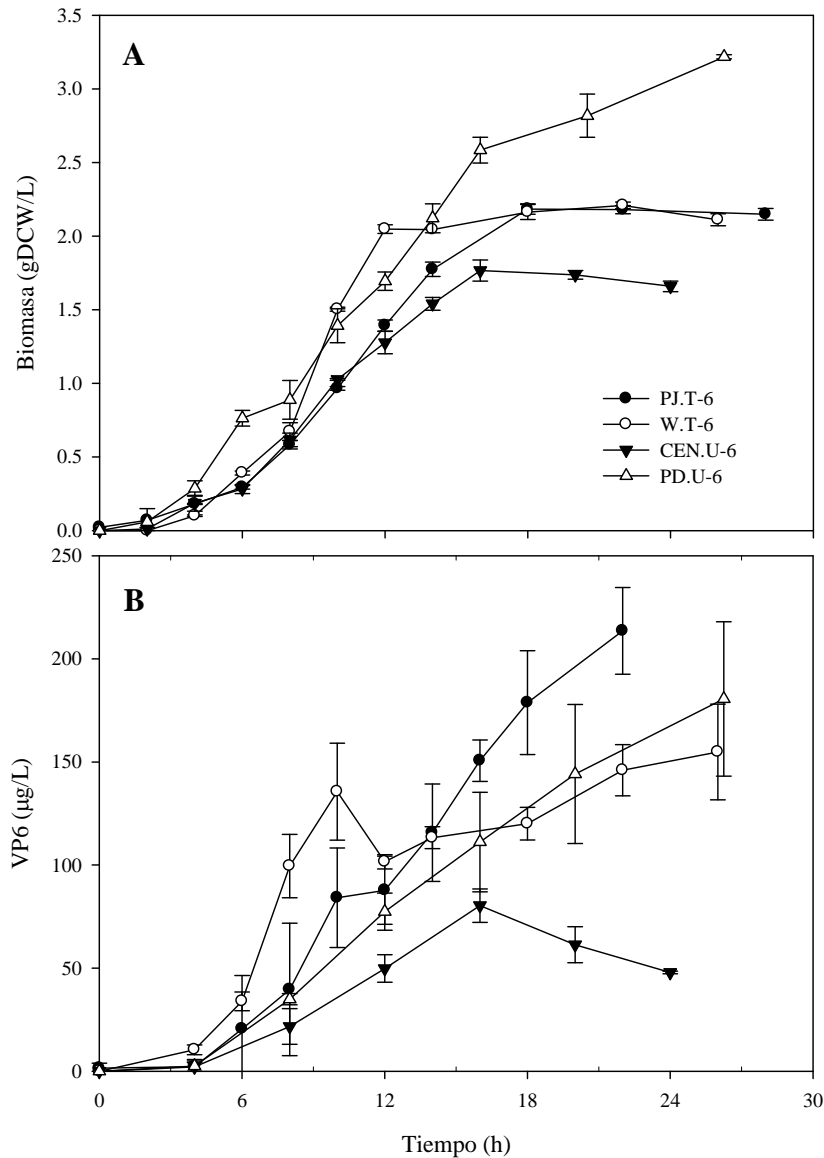


Figura 7.18. Cultivos por lote de cepas de *S. cerevisiae* productoras de VP6 en medio CSM. A) Biomasa y B) Concentración de VP6. Se muestran los valores promedio y la desviación estándar de tres cultivos individuales.

Los rendimientos específicos $Y_{P/X}$ y $Y_{P/S}$ de la cepa PJ.T-6 fueron los mejores entre las cepas analizadas. En general, la producción de VP6 estuvo asociada al crecimiento, pero la concentración de VP6 disminuyó en la cepa CEN.U-6 después del agotamiento de la glucosa (ver anexo B.1). Este comportamiento posiblemente esté asociado a una alta actividad proteasa al final del cultivo. Un comportamiento similar ha sido reportado durante la producción de PPV en cultivos por lote después del agotamiento de la glucosa y antes de la asimilación de etanol [68]. La productividad específica más baja fue observada en la cepa PD.U-6, mientras que la productividad volumétrica más baja fue obtenida con la cepa CEN.U-6. Debido al descenso en la concentración de VP6 observada en los cultivos de la cepa CEN.U-6 después del agotamiento de la glucosa y su baja productividad volumétrica, esta cepa fue descartada para la producción simultánea de las tres proteínas de rotavirus y las mejoras en los cultivos por lote alimentado. No se observó un efecto en el tipo de plásmido usado sobre la productividad de VP6, a pesar de que los plásmidos de tipo episomal (YE_p) tienen hasta 100 copias por célula [69]. Las cepas PJ.T-6 y PD.U-6 tuvieron las productividades volumétricas más altas en los cultivos por lote, por lo cual sus cepas parentales (PJ69-4a y PD 83B.1d) fueron utilizadas para construir las nuevas cepas con los plásmidos multicopia pWR6 y pWR267 que son capaces de producir VP6 (cepa PJ.U-6) y VP2, VP6 and VP7 en la misma célula (PD.U-267 y PJ.U-267). La producción de proteínas heterólogas de estas nuevas cepas fue comparada en cultivos por lote alimentado de tipo exponencial.

7.6.2 Cultivos por lote alimentado

Se realizaron cultivos por lote alimentado de las cepas PD.U-6, PD.U-267, PJ.U-6 y PJ.U-267. Basados en los parámetros estequiométricos que se presentan en la tabla 7.5 y utilizando las ecuaciones descritas en detalle en el numeral 6.6, se establecieron los perfiles de alimentación exponencial, ajustando el flujo a un valor de 0.19 h^{-1} , el cual corresponde a aproximadamente $0.75 \mu_{\max}$ de la cepa PJ.T-6. Para estos cultivos se siguió la producción de biomasa y concentración de VP6 durante todo el cultivo (Figura 7.19).

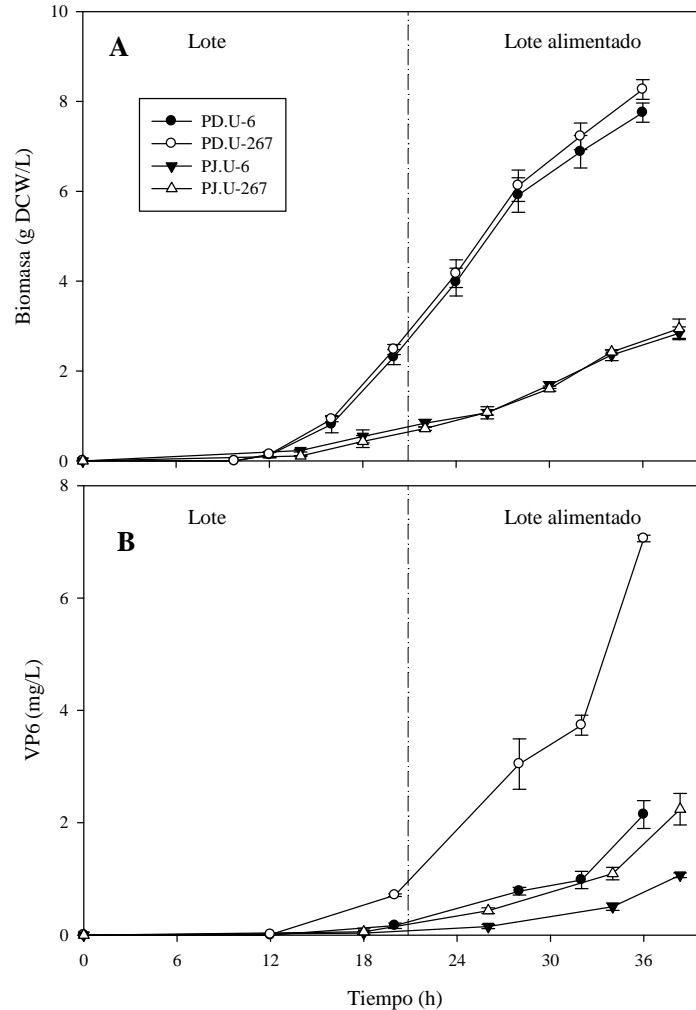


Figura 7.19. Cultivos por lote alimentado de cepas de *S. cerevisiae* productoras de VP6 ó VP2, VP6 y VP7, crecidos en medio CSM suplementado con Leucina 1.8 mM, glutamato 20 mM y succinato 50 mM. A) Cinética de Biomasa medida en peso seco y B) Concentración de VP6, medida por ELISA. Se muestran los valores promedio y la desviación estándar de tres cultivos individuales.

Los datos completos de biomasa, consumo de glucosa y producción de metabolitos se encuentran consignados en el Anexo B.2. Los rendimientos y productividades de las cepas se ilustran en la figura 7.20. Tal como se pudo observar en los cultivos por lote, las cepas con fondo genético de PJ-694a crecieron más lento en comparación con las cepas con fondo genético PD 83B.1d, antes y después de la fase de alimentación. En concordancia con estos resultados, las concentraciones de biomasa máxima obtenidas por las cepas PJ.U-6 y PJ.U-267 fueron 3.5 veces menores que los valores obtenidos para las cepas PD.U-6 y PD.U-267. La concentración de VP6 antes de la alimentación fue inferior a 1 mg/mL en todas las cepas. VP6 se acumuló rápidamente durante la fase de

alimentación. Las concentraciones máximas de VP6 estuvieron en un rango entre 1 y 7 mg/L.

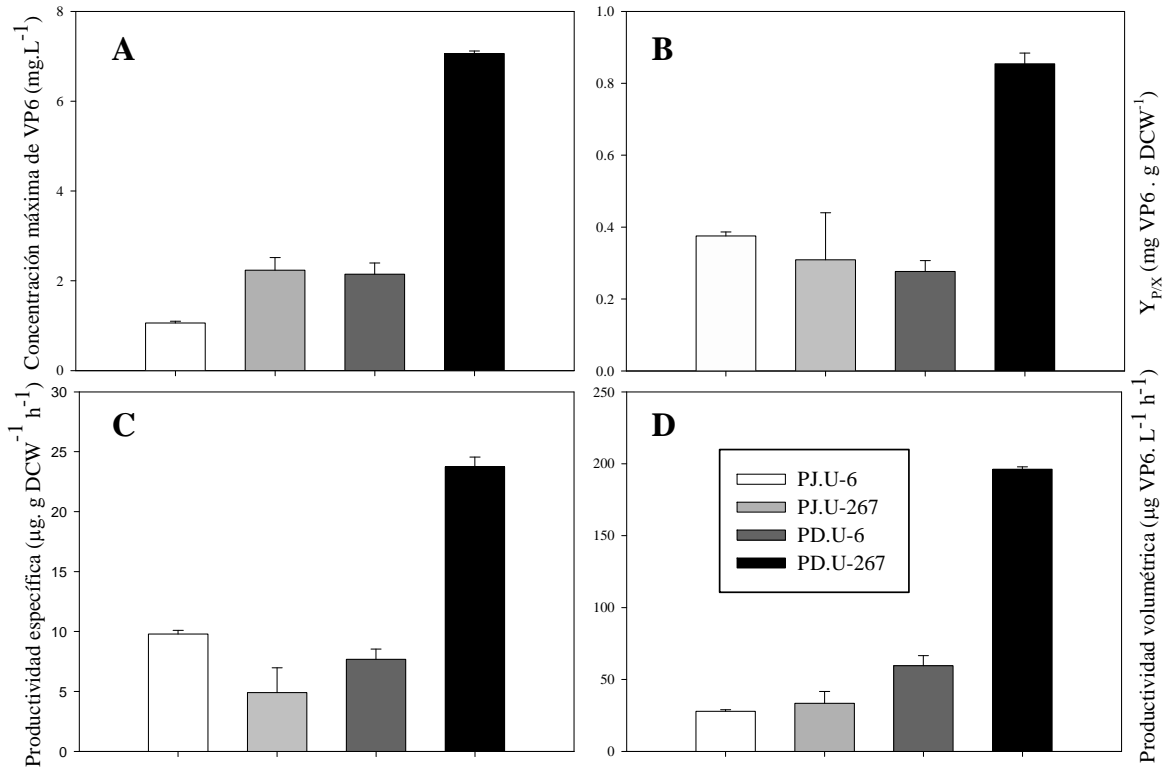


Figura 7.20. Formación de producto y productividades en cultivos por lote alimentado de cepas de *S. cerevisiae*. A) Concentración de VP6 máxima, B) Rendimientos de VP6 en biomasa, C) Productividades específicas and D) Productividades volumétricas. Se muestran los valores promedio y la desviación estándar de tres cultivos individuales.

De forma interesante, la concentración de VP6 en las cepas que producían sólo VP6, fue entre dos y tres veces menor que cuando VP6 fue coexpresada con VP2 y VP7 (Figura 7.20 A). Este comportamiento podría estar asociado a una estabilización sinérgica de las tres proteínas estructurales, protegiéndolas de las proteasas presentes en el entorno intracelular. El rendimiento biomasa producto fue similar entre las cepas PJ.U-6, PJ.U-267 y PD.U-6, pero se incrementó más de tres veces para la cepa PD.U-267 (Fig. 7.20B), reflejando un uso más eficiente de nutrientes hacia la producción de proteína heteróloga por parte de esta cepa.

Los cultivos en lote alimentado mejoraron los valores de producción de proteína heteróloga, incrementando la concentración de VP6, 11 veces cuando se expresaba sola y 28 veces cuando se coexpresaba con VP2 y VP7, al ser comparados con los primeros cultivos por lote realizados en este proyecto. La cepa PD.U-267 tuvo las productividades específicas y volumétricas más altas (Figs. 7.20C y 7.20D), por lo que fue la cepa utilizada para el resto del estudio.

7.7 Extracción de proteína intracelular y purificación de PPV

La extracción de proteína se realizó por dos metodologías: mediante ruptura mecánica usando la prensa *french* a una presión de 18,000 psi ó con buffer de extracción química. La ruptura mecánica libera una mayor cantidad de componentes intracelulares solubles e insolubles en fase acuosa (DNA, lípidos y organelos) que son separados mediante centrifugaciones sucesivas. El método químico permea las paredes de las células y extrae mayoritariamente las proteínas solubles, aunque también requiere un proceso de centrifugación posterior a la extracción. El diagrama de flujo de la purificación primaria por ambos métodos se esquematiza en la figura 7.21. Las muestras procesadas por ruptura mecánica se utilizaron preferentemente para los ensayos *in vivo*, mientras que las muestras procesadas por extracción química se utilizaron para microscopía electrónica.

Los extractos celulares fueron analizados en diferentes etapas de purificación para evidenciar la presencia de las proteínas VP2, VP6 y VP7 en su forma nativa mediante *immunoblotting* usando anticuerpos monoclonales para cada proteína (Figura 7.22). Este ensayo permitió identificar las tres proteínas en los extractos primarios, en el *pellet* del colchón de sacarosa y en las bandas opalescentes del gradiente de CsCl.

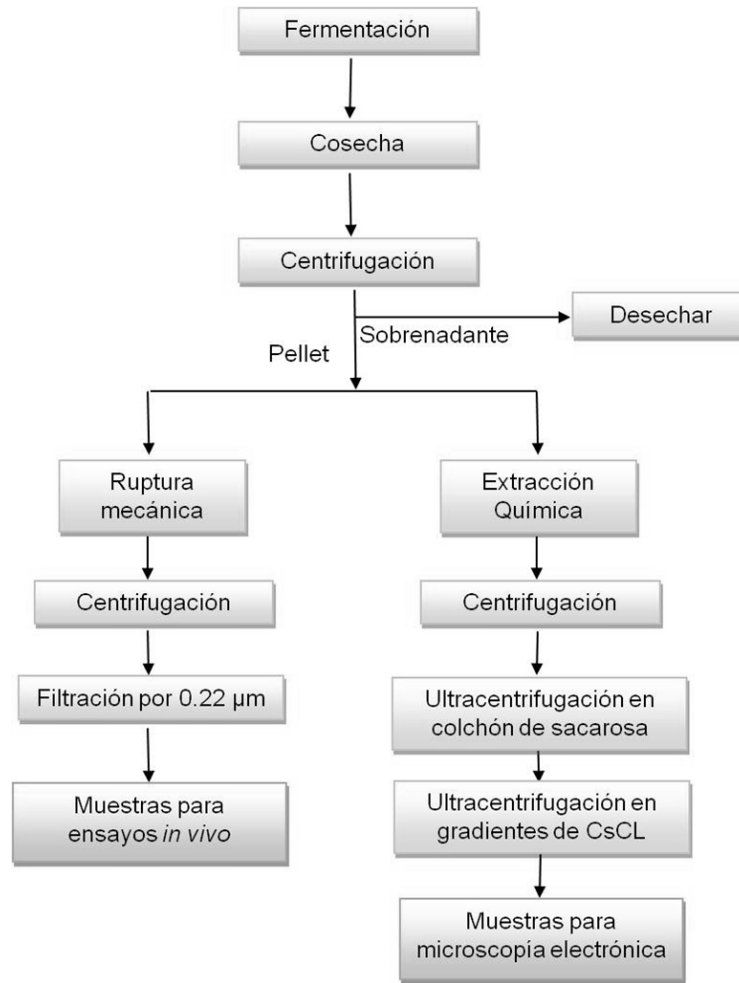


Figura 7.21. Diagrama de flujo de los pasos de purificación primaria para proteína intracelular de *S. cerevisiae* PD.U-267.

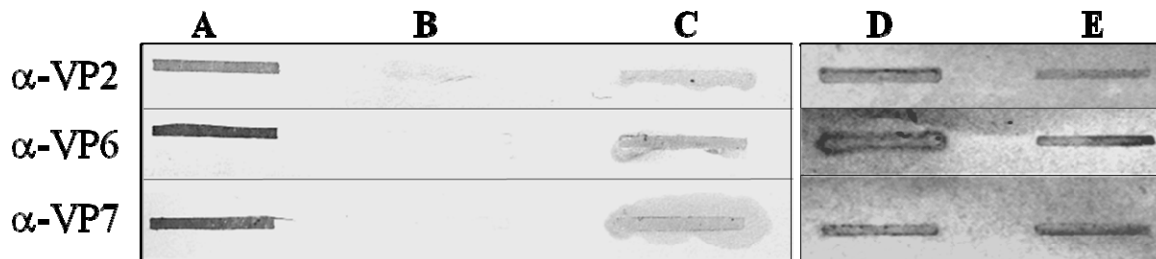


Figura 7.22 Slot blot para proteínas de rotavirus en diferentes etapas de purificación. A) Cepa de rotavirus SA-11 (Control positivo) B) Extracto de un cultivo de la cepa PD.U-C (Control negativo). C) Extracto celular de una cepa PD.U-267 al final del cultivo por lote alimentado D) Pellet proveniente del colchón de sacarosa, reconstituido en buffer TNC. E) Banda de gradiente de CsCl. Se usaron 3 anticuerpos monoclonales 3A8, 255 e IC3 para VP2, VP6 and VP7, respectivamente. Se cargaron 200 µL de cada muestra.

Las bandas de gradientes de CsCl fueron analizadas por SDS-PAGE y Western Blot (Figuras 7.23A y 7.23B), mostrando la presencia de las tres proteínas de rotavirus. Mediante densitometría de geles de SDS-PAGE se evidenció una relación másica de cada una de las proteínas de rotavirus VP2:VP6:VP7 de 1:12:4 en las muestras de las bandas de gradientes mientras que la relación másica de las partículas nativas es de 1:2.8:2.2.

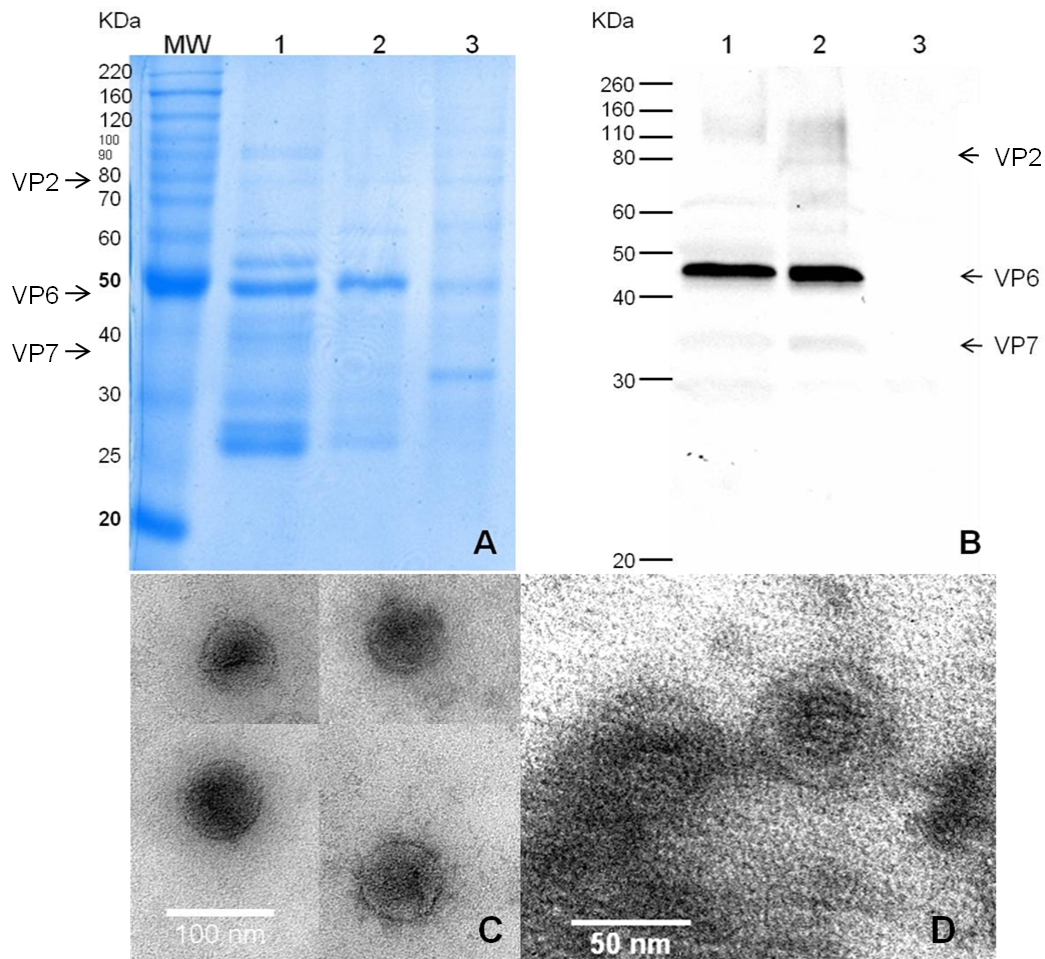


Figura 7.23. Análisis de PPV de rotavirus obtenidas por gradientes de CsCl. A) y B) SDS-PAGE y Western blot de dos bandas opalescentes aisladas de dos cultivos diferentes. (Carriles 1 y 2). Extracto celular de un cultivo de la cepa PD.U-C como control negativo (Carril 3). Cada carril fue cargado con 5 μ g de proteína total. C) y D) Micrografías electrónicas de PPV de rotavirus recuperadas por gradientes de cloruro de cesio. Magnificación 150,000X and 250,000X, respectivamente.

7.8 Microscopía electrónica

Las muestras provenientes de la purificación por gradientes de CsCl fueron observadas al microscopio electrónico. Si bien las bandas opalescentes no aparecieron tan claramente como cuando se producen en células de insecto, la observación al microscopio permitió observar claramente estructuras que corresponden al tamaño y morfología previamente reportados [70] (Fig. 7.23C y 7.23D). Las PPV fueron medidas usando el software ImageJ (Wayne Rasband, NIH, USA), obteniéndose un diámetro promedio de 71 ± 5 nm.

Este es el primer reporte de producción de PPV de rotavirus producidas en levaduras y abre la puerta para la exploración de otro tipo de partículas multiméricas tradicionalmente producidas en otras plataformas de expresión. A pesar de que las PPV de rotavirus pudieron ser observadas mediante microscopía electrónica, un reto que aún se mantiene pendiente es mejorar la concentración de proteína heteróloga para promover un mejor ensamblaje de partículas. La relación VP7/VP6 medida por densitometría en los geles de SDS-PAGE fue 59% inferior que la que se presenta en la partículas de triple capa completamente formadas (Relación en masa VP7/VP6=0.83). La relación de proteínas observada en las muestras de gradiente de CsCl y analizadas por densitometría, indican que solamente el 41% de las PPV obtenidas correspondían a tIRLP, como resultado de una baja producción o ensamblaje ineficiente de VP7. El incremento en el ensamblaje podría lograrse de dos formas, ya sea por ensamblaje *in vivo*, enfoque que ha sido aplicado a nivel laboratorio e industrial para el desarrollo de vacunas contra Hepatitis B en levaduras o ensamblajes *in vitro*, como es el caso de la vacuna de papiloma humano desarrollada en levadura, en la cual, la proteína L1 es producida, desensamblada y reensamblada *in vitro* en para formar las cápsides [71]. Este enfoque ha mostrado ser económicamente más rentable y se obtienen productos más homogéneos, con mejores resultados inmunológicos [72, 73]. Por otra parte, las productividades volumétricas de nuestro proceso aún se encuentran un orden de magnitud por debajo de las alcanzadas en el SCI-BV, pero pueden ser competitivos si se optimiza el proceso de ensamblaje.

7.9 Evaluación de la capacidad inmunogénica

7.9.1 Límites mínimos de proteína heteróloga

Los ratones de estos ensayos fueron inoculados con 1 mg de proteína intracelular obtenida mediante ruptura mecánica y filtrados por membranas de 0.22 μm para eliminar productos insolubles y contaminantes. En los primeros ensayos, 1 mg de proteína contenía 0.36 μg de VP6 de rotavirus y cantidades no cuantificadas de VP2 y VP7. Esta baja cantidad de proteína proveniente de cultivos por lote de la cepa PD.U-267 se usó para evaluar los límites mínimos de respuesta contra rotavirus. Los extractos proteicos contienen adyuvantes naturales provenientes de la pared celular de la levadura (mananos y β -glucán, principalmente). Mientras que los títulos de IgA's en heces no fueron detectables, los títulos de IgG's en heces pudieron ser cuantificados y tuvieron un incremento luego de la tercera semana de inoculación (Fig. 7.24).

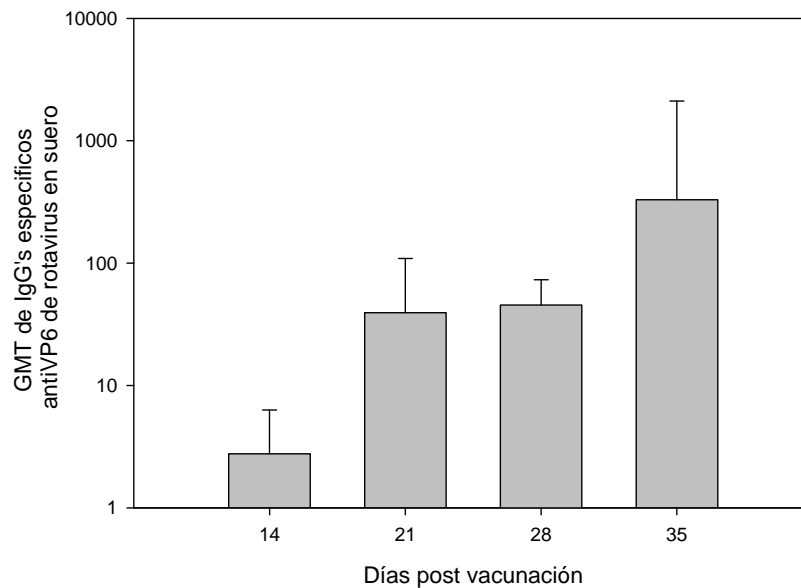


Figura 7.24. Media geométrica de los títulos de IgG's específicos anti VP6 de rotavirus en suero de ratones. Usando como antígeno una dosis de 1 mg de proteína intracelular de levaduras, que contiene 0.3 μg de VP6 y cantidades no cuantificadas de VP2 y VP7. Las barras de error representan el error estándar entre los individuos analizados.

En un trabajo paralelo, se probaron otras presentaciones de antígenos candidato: VP6 en forma tubular y DLP (VP2/VP6) purificadas. Estos antígenos fueron producidos en el SCI-BV. Los otros antígenos fueron probados de igual manera que los producidos en

levaduras, en una sola dosis por vía subcutánea, sin adyuvantes. La respuesta desarrollada por los antígenos de levaduras fue más tardada y se desarrolló después de la cuarta semana o posterior, pero alcanzó títulos de anticuerpos en el mismo orden de magnitud que los de otros antígenos probados hacia la quinta semana después de la vacunación. En la figura 7.25, se grafican los resultados obtenidos a manera de comparación:

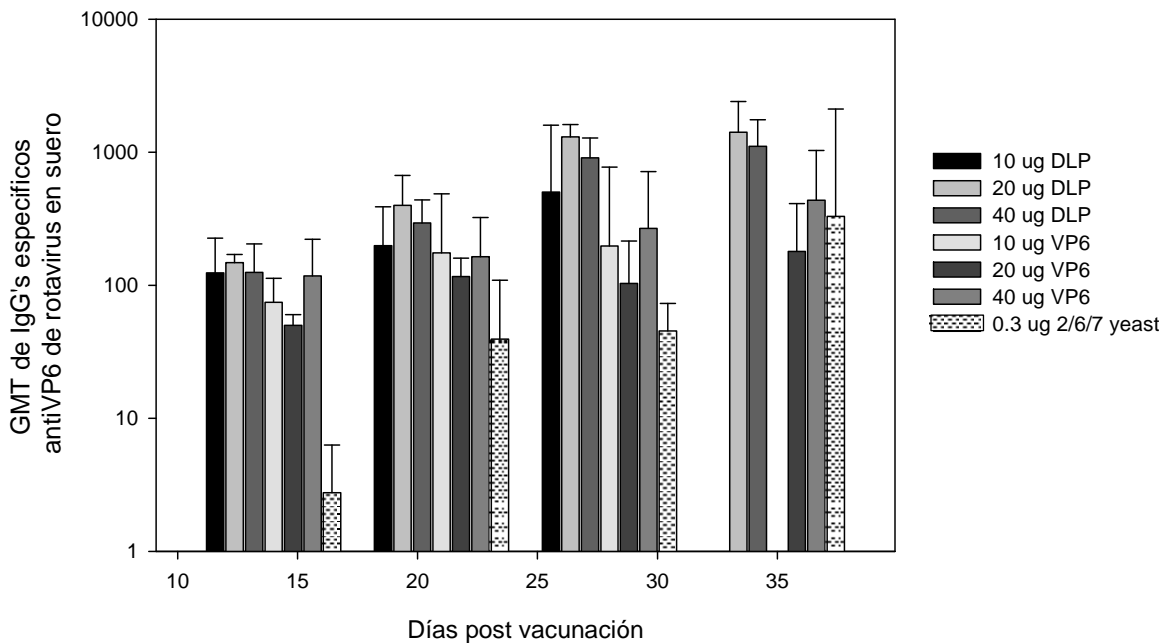


Figura 7.25. Media geométrica de los títulos de IgG's específicos anti VP6 de rotavirus en suero de ratones para diferentes antígenos y dosis. Las barras de error representan el error estándar entre los individuos analizados.

7.9.2 Ensayos con una ó dos dosis de antígeno

Nuevos ensayos evaluaron las diferencias en la inducción de los anticuerpos desarrollados al inmunizar en una o dos ocasiones, grupos de ratones CD-1 vía subcutánea, con dosis de extracto de levaduras que contenían 3 µg de VP6 y cantidades no cuantificadas de VP2 y VP7. En la figura 7.26 se observan los valores de absorbancia obtenidos para IgG's antiVP6 de rotavirus en suero de los tres grupos inoculados por vía subcutánea, a los 56 días post vacunación y se comparan con los valores obtenidos para los animales inmunizados con 0.3 µg de VP6.

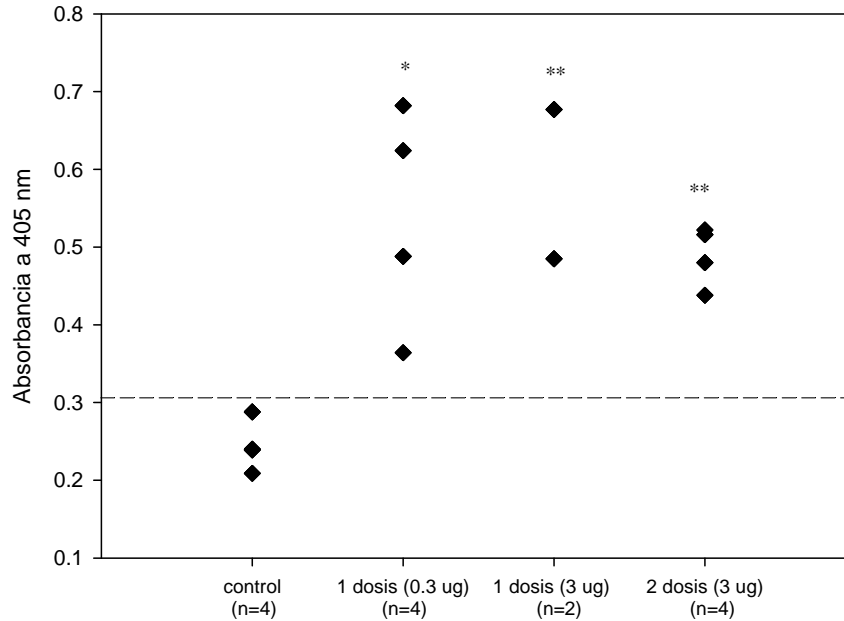


Figura 7.26. Análisis de ELISA de suero diluido (1:5) que muestra la presencia de IgG's anti VP6 de rotavirus en los grupos de ratones del estudio. La línea punteada representa el corte a 405nm del promedio + 2 veces la desviación estándar para el grupo control (inoculado con extracto de la cepa PD.U-C). *, Diferencia significativa con respecto al grupo control ($P<0.05$), **, Diferencia significativa con respecto al grupo control ($P<0.01$).

Se observa una diferencia significativa entre los grupos vacunados y los grupos control, pero los valores de absorbancia de los animales vacunados con una y dos dosis no presentan diferencias significativas. Estos mismos ratones fueron retados a los 135 días con rotavirus bovino de la cepa EDIM *wt* proveniente de intestino de ratón, a una concentración de 1×10^5 UFF, para evidenciar la replicación viral y títulos de anticuerpos en heces, de forma similar al modelo desarrollado por Ward *et al*, [74] y en colaboración con el grupo del Dr. Fernando Esquivel (Facultad de farmacia, UAEM). La excreción de virus fue monitoreada por ELISA durante 8 días posteriores al reto. Se tienen 3 grupos: 2 ratones control, inoculados con extracto sin proteínas de rotavirus, 2 ratones vacunados con 1 dosis de antígeno (3 μ g de VP6 y cantidades no cuantificadas de VP2 y VP7) y 4 ratones con dos dosis de antígeno. Las figuras 7.27 A y B muestran la replicación viral en los ratones con una y dos dosis, respectivamente, comparados con el control.

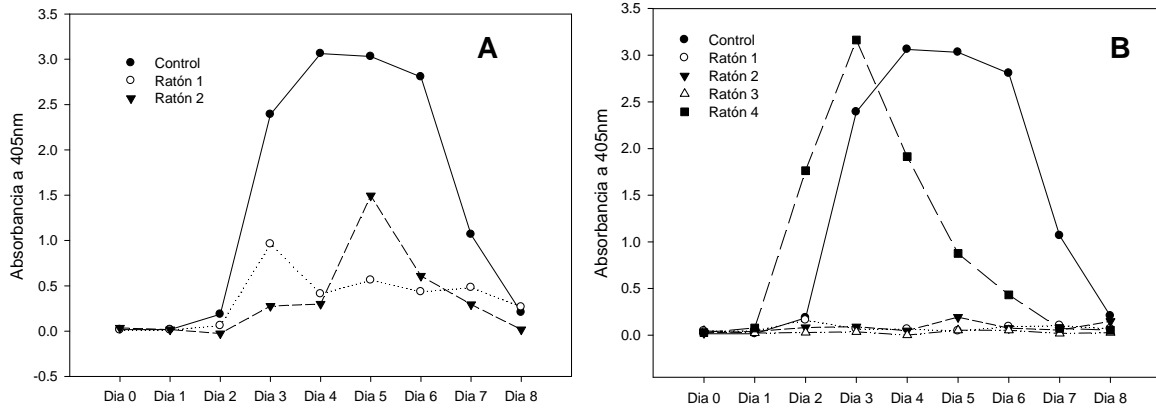


Figura 7.27. Análisis de ELISA de heces diluidas (5% P/V) que muestra la replicación viral de rotavirus de la cepa EDIM en animales vacunados con 1 dosis (A) o dos dosis (B) de extracto de levaduras que contiene 3 µg de VP6 y cantidades de VP2 y VP7 no cuantificadas. La curva control es la replicación viral de uno de los ratones del grupo vacunados con 1 mg de extracto de levadura de la cepa PD.U-C, el cual no contiene proteínas de rotavirus.

Como se puede observar, salvo el ratón 4 del grupo de dos dosis, los demás animales presentan una disminución considerable en la replicación viral con respecto a los ratones control. Los animales con dos dosis no presentan excreción de virus (salvo el ratón 4), mostrando una protección completa desde el día del reto. Estos resultados podrían indicar la presencia de anticuerpos neutralizantes anti VP7. Los animales con una dosis presentan valores moderados de replicación viral, mostrando la necesidad de aplicar al menos dos dosis de vacuna para obtener una mejor protección.

De los ensayos *in vivo* se pudo evidenciar el potencial de las proteínas heterólogas y PPV producidas en levaduras, formuladas directamente de los extractos celulares, ya que pudieron despertar una respuesta inmune humoral a bajas dosis de antígeno, sin el uso de adyuvantes y con procesos de purificación primarios, comunes en la industria veterinaria. Esta respuesta inmune puede estar asociada a la presencia de componentes celulares (β -Glucán y α -mananos, principalmente) que son reconocidos por TLR2 y desatan una respuesta de tipo proinflamatorio, que coadyuva de manera natural hacia la producción de anticuerpos específicos anti-rotavirus. La ausencia de IgA's en suero o en heces está asociada a la ruta de administración, ya que la presencia de IgA's es más predominante cuando se inocula vía mucosas, en comparación con las vías parenterales. También podrían ser células T efectoras dirigidas contra VP6 ya que se ha demostrado

que ratones inmunizados con VP6 inducen protección por células T cooperadoras, predominantemente [75].

El modelo de infección por rotavirus en ratón adulto permitió evidenciar una protección heterotípica de los ratones vacunados, con dos dosis de extractos de levadura que contienen proteínas de rotavirus bovino del genotipo G6, al ser retados con un rotavirus murino del genotipo G3, P[16]. Este modelo puede ser complementado con un análisis de la respuesta inmunológica en ratones recién nacidos, alimentados con calostro y leche de madres vacunadas con estos mismos antígenos. Las crías al ser retadas con rotavirus murino permitirán evidenciar una protección asociada a la inmunización pasiva, mediante el seguimiento de la carga viral, anticuerpos y la resolución de los síntomas asociados a la enfermedad.

CAPÍTULO 8

CONCLUSIONES

El tipo de plásmido utilizado para la producción de proteína VP6 no influyó significativamente sobre la concentración máxima de proteína heteróloga alcanzada. La concentración de VP6 máxima alcanzada está relacionada directamente con el tipo de cepa utilizada en cultivos por lote. Las cepas derivadas del fondo genético de *S. cerevisiae* PD 83B.1d fueron los mejores candidatos evaluados en el presente estudio para la producción de proteínas de rotavirus, mientras que las cepas derivadas del fondo genético de *S. cerevisiae* CEN.PK.113-5D fueron descartadas debido a la alta actividad proteasa alcanzada al final del cultivo y evidenciada en una disminución de proteína heteróloga después de la hora 16 en cultivos por lote.

Es posible obtener partículas pseudovirales de rotavirus de múltiples capas en *S. cerevisiae*, aunque la eficiencia de ensamblaje es muy baja. Es necesario mejorar las concentraciones de proteína heteróloga por célula para mejorar la formación de estructuras con la arquitectura esperada.

La suplementación de medio de cultivo CSM permitió mejorar las concentraciones de proteína heteróloga por unidad de biomasa.

La disminución en el metabolismo respiro-fermentativo de las cepas de *S. cerevisiae* evidenciado en la disminución de la producción de etanol, propició el incremento en la producción de biomasa y proteína heteróloga, para los cultivos por lote y lote alimentado.

Los extractos celulares que contienen las proteínas VP2, VP6 VP7 y PPV de rotavirus son capaces de generar una respuesta inmune de tipo humoral, a bajas dosis de antígeno, al ser inoculadas vía subcutánea. Se demostró además que dos dosis de 1 mg de extracto celular que contienen 3 µg de VP6 y cantidades no cuantificadas de VP2 y VP7 eran

capaces de proteger a ratones adultos de la infección por rotavirus, disminuyendo en un 95% la replicación viral de rotavirus cepa EDIMwt.

La presencia de componentes celulares (β -Glucán y α -mananos, principalmente) coadyuvan de manera natural hacia la producción de anticuerpos específicos anti-rotavirus, requiriéndose menores dosis de antígeno para obtener títulos de anticuerpos IgG's del mismo orden de magnitud que los títulos obtenidos al inmunizar con dosis de antígenos entre 10 y 40 veces mayores producidos en el SCI-BV.

Dos dosis de extracto de levadura que contiene 3 μ g de VP6 y cantidades de VP2 y VP7 no cuantificadas fueron suficientes para evitar la replicación viral en ratones adultos infectados por rotavirus murino.

CAPÍTULO 9

PERSPECTIVAS

- Mejorar la producción de proteínas heterólogas mediante el uso de medios de cultivo con componentes complejos, principalmente fuentes de nitrógeno con altos contenidos de aminoácidos o péptidos y que no contenga nucleótidos (P ej. Casaminoácidos u otros hidrolizados proteicos).
- Mejorar los perfiles de alimentación de los cultivos por lote alimentado utilizando como variable de respuesta el coeficiente respiratorio ($RQ \approx 1$) para que el metabolismo esté balanceado hacia la ruta respiratoria más que a la fermentativa.
- Evaluar el uso de extractos de levadura que contienen las proteínas de rotavirus, en diferentes dosis, utilizando otras vías de inoculación asociadas a mucosas (P ej. Intranasal, oral o rectal) para evaluar las respuestas de tipo humoral y/o celular.
- Corroborar mediante inmunomicroscopía electrónica que las partículas pseudovirales de rotavirus generadas poseen las proteínas VP2, VP6 y VP7.
- Evaluar los antígenos obtenidos en el presente estudio en el modelo de protección pasiva, vacunando madres gestantes y retando a las crías, para corroborar inmunización pasiva y desarrollo de síntomas de la enfermedad diarreica en el modelo de ratón recién nacido.
- Evaluar el uso de adyuvantes con los antígenos obtenidos en el presente estudio.
- Determinar la contribución de cada una de las diferentes proteínas de rotavirus en la protección de los ratones ante la infección por rotavirus.

- Realizar ensayos de neutralización de la infección contra rotavirus murino EDIMwt en ensayos *in vitro*, utilizando los sueros colectados en el presente estudio, para evidenciar la generación de anticuerpos neutralizantes anti VP7.
- Realizar un estudio de factibilidad técnico-económica para producción de vacunas contra rotavirus bovino en *S. cerevisiae*.

CAPÍTULO 10

PRODUCTOS GENERADOS

10.1 Artículos arbitrados

1. **Rodriguez-Limas WA**, Tyo KE, Nielsen J, Ramirez OT, Palomares LA: **Molecular and process design for rotavirus-like particle production in *Saccharomyces cerevisiae***. *Microb Cell Fact.* 10:33. Ver Anexo D.
2. **Rodriguez-Limas WA**, Flores-Samaniego B, de la Mora G, Ramírez OT, Palomares LA: **Genotypification of bovine group A rotavirus in Mexico**. *Vaccine* 2009, **27**(46):6411-6414. Este artículo reporta resultados del trabajo de maestría. Ver Anexo E.
3. **Rodriguez-Limas WA**, Pastor AR, Esquivel-Soto E, Esquivel-Guadarrama F, Ramirez OT, Palomares LA: **Immunogenicity and protective efficacy of yeast extracts containing rotavirus-like particles produced in *Saccharomyces cerevisiae* administrated subcutaneously or intranasally to mice**. (En preparación).

10.2 Solicitud de patente

Método de producción una vacuna recombinante de tipo veterinario basada en estructuras virales proteicas multiméricas de rotavirus expresada en levaduras

10.3 Presentación en congresos nacionales e internacionales

1. **Rodríguez-Limas, WA.**, Ramírez, OT., Palomares LA. Designing bovine rotavirus-like particles production in yeast. Use of molecular and bioprocess tools. Third International

- Congress in Food Science and Food Biotechnology in Developing countries. Querétaro, México, Octubre 15 al 18 de 2008. Poster.
2. **Rodríguez-Limas, WA.**, Folch-Mallol, JL., Ramírez, OT., Palomares, LA. Construction of different strains of *Saccharomyces cerevisiae* for rotavirus protein expression. First International Congress on Biotechnology and Bioengineering. México D.F., México, Noviembre 5 al 7 de 2008. Oral.
 3. **Rodríguez-Limas, WA.**, Ramírez, OT., Palomares, LA. Process design for the expression of rotavirus VP6 protein in *Saccharomyces cerevisiae*. 27th International Specialized Symposium on Yeast. Pasteur Institute, Paris, Francia. Agosto 26 al 29 de 2009. Oral.
 4. Palomares, LA. **Rodríguez-Limas, WA.**, Ramírez, OT. Strategies for the production of a veterinary vaccine based on recombinant rotavirus VP6. Vaccine Technology III. Nuevo Vallarta, México, Junio 6 al 11 de 2010. Poster.
 5. **Rodríguez-Limas, WA.** Tyo, KEJ, Ramírez, OT., Palomares, LA., Nielsen. J. Transcriptomic analysis as a tool for increasing rotavirus VP6 protein production in *Saccharomyces cerevisiae*. 35th FEBS Congress. Göteborg, Suecia. Junio 26 a Julio 1 de 2010. Poster.
 6. **Rodríguez-Limas, WA.**, Ramírez, OT., Palomares, LA. Diseño del proceso de producción de una vacuna veterinaria contra rotavirus bovino producida en *Saccharomyces cerevisiae*. XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Querétaro, México. Junio 19 al 25 de 2011. Oral.
 7. Pastor-Flores, AR., Contreras, MA., **Rodríguez-Limas, WA.**, Ramírez, OT., Palomares LA. Análisis de la respuesta inmunogénica en ratones CD-1 inmunizados con VP6 y dIPPV. XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Querétaro, México. Junio 19 al 25 de 2011. Oral.
 8. **Rodríguez-Limas, WA.**, Ramírez, OT., Palomares, LA. Molecular and process design for rotavirus-like particle production in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochemical and Molecular Engineering XVII Conference. Seattle, Estados Unidos. Junio 26 al 30 de 2011. Poster.

10.4 Artículo *in extenso*

Rodríguez-Limas WA, Folch-Mallol, JL., Ramírez OT, Palomares LA. **Construction of different strains of *Saccharomyces cerevisiae* for rotavirus protein expression.** En las memorias del First International Congress on Biotechnology and Bioengineering. Ver Anexo F.

10.5 Premios y distinciones

Premio **Sergio Sánchez Esquivel 2008**, en la categoría: Protocolos de tesis de Doctorado. Dicho premio lo otorga la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería.

El proyecto de investigación fue ganador del **Biocamp 2009 México**, organizado por Novartis Farmacéutica y el Biocluster Nuevo León con la oportunidad de participar en el campamento global en Estados Unidos. Luego, el estudiante William Rodríguez-Limas recibió la distinción: **Certificate of excellence: Outstanding performance**, en la edición del **Global Biocamp 2009**. Novartis Biotechnology leadership camp, realizado en la ciudad de Cambridge, Massachusetts, del 26 al 30 de octubre de 2009.

Premio Canifarma Veterinaria 2009, Dr. Alfredo Téllez Girón Rode. Categoría: *Desarrollo tecnológico. Desarrollo de una vacuna recombinante contra rotavirus bovinos prevalentes en México.* Laura A. Palomares, **William A. Rodríguez-Limas**, Jimmy A. Mena, Ricardo Castro Acosta, Ana Ruth Pastor, Vanessa Hernández y Octavio Tonatiuh Ramírez. **Cámara Nacional de Industria Farmacéutica.** México. 14 de abril de 2009

REFERENCIAS

1. Martella V, Banyai K, Matthijnssens J, Buonavoglia C, Ciarlet M: **Zoonotic aspects of rotaviruses**. *Vet Microbiol* 2010, **140**(3-4):246-255.
2. **Diarrea neonatal de los terneros. Etiopatología, tratamiento y control**. [http://www.inta.gov.ar/balcarce/info/documentos/ganaderia/bovinos/sanidad/enf_dig/diarreaneon.htm]
3. Rodriguez-Limas WA: **Identificación de genotipos de rotavirus bovino prevaecientes en México como herramienta para el desarrollo de una vacuna recombinante**. Tesis de maestría: Universidad Nacional Autónoma de México; 2007.
4. **Efficacy Requirements and Label Claims for Bovine Rotavirus Vaccine** [http://www.aphis.usda.gov/animal_health/vet_biologics/publications/notice_04_16.pdf]
5. Noad R, Roy P: **Virus-like particles as immunogens**. *Trends Microbiol* 2003, **11**(9):438-444.
6. Plotkin SA: **Vaccines: past, present and future**. *Nat Med* 2005, **11**(4 Suppl):S5-11.
7. Lawton JA, Zeng CQ, Mukherjee SK, Cohen J, Estes MK, Prasad BV: **Three-dimensional structural analysis of recombinant rotavirus-like particles with intact and amino-terminal-deleted VP2: implications for the architecture of the VP2 capsid layer**. *J Virol* 1997, **71**(10):7353-7360.
8. Patton JT, Spencer E: **Genome replication and packaging of segmented double-stranded RNA viruses**. *Virology* 2000, **277**(2):217-225.
9. Mena JA, Ramirez OT, Palomares LA: **Intracellular distribution of rotavirus structural proteins and virus-like particles expressed in the insect cell-baculovirus system**. *J Biotechnol* 2006, **122**(4):443-452.
10. Shinozaki K, Yamanaka T, Tokieda M, Shirasawa H, Simizu B: **Isolation and serial propagation of human group C rotaviruses in a cell line (CaCo-2)**. *J Med Virol* 1996, **48**(1):48-52.
11. Estes MK: **Rotaviruses and their replication**. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1996.
12. Palomares LA, Ramirez OT: **Challenges for the production of virus-like particles in insect cells: The case of rotavirus-like particles**. *Biochem Eng J* 2009, **45**(3):158-167.
13. Pattenden LK, Middelberg AP, Niebert M, Lipin DI: **Towards the preparative and large-scale precision manufacture of virus-like particles**. *Trends Biotechnol* 2005, **23**(10):523-529.
14. Fischlechner M, Donath E: **Viruses as building blocks for materials and devices**. *Angew Chem Int Ed Engl* 2007, **46**(18):3184-3193.
15. Huang CJ, Lowe AJ, Batt CA: **Recombinant immunotherapeutics: current state and perspectives regarding the feasibility and market**. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010, **87**(2):401-410.

16. Koutsky LA, Ault KA, Wheeler CM, Brown DR, Barr E, Alvarez FB, Chiacchierini LM, Jansen KU: **A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine.** *N Engl J Med* 2002, **347**(21):1645-1651.
17. Villa LL, Costa RL, Petta CA, Andrade RP, Ault KA, Giuliano AR, Wheeler CM, Koutsky LA, Malm C, Lehtinen M *et al*: **Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial.** *Lancet Oncol* 2005, **6**(5):271-278.
18. Shuttleworth G, Eckery DC, Awram P: **Oral and intraperitoneal immunization with rotavirus 2/6 virus-like particles stimulates a systemic and mucosal immune response in mice.** *Arch Virol* 2005, **150**(2):341-349.
19. Kim Y, Nielsen PR, Hodgins D, Chang KO, Saif LJ: **Lactogenic antibody responses in cows vaccinated with recombinant bovine rotavirus-like particles (VLPs) of two serotypes or inactivated bovine rotavirus vaccines.** *Vaccine* 2002, **20**(7-8):1248-1258.
20. Fernandez FM, Conner ME, Hodgins DC, Parwani AV, Nielsen PR, Crawford SE, Estes MK, Saif LJ: **Passive immunity to bovine rotavirus in newborn calves fed colostrum supplements from cows immunized with recombinant SA11 rotavirus core-like particle (CLP) or virus-like particle (VLP) vaccines.** *Vaccine* 1998, **16**(5):507-516.
21. Perez Filgueira DM, Mozgovej M, Wigdorovitz A, Dus Santos MJ, Parreno V, Trono K, Fernandez FM, Carrillo C, Babiuk LA, Morris TJ *et al*: **Passive protection to bovine rotavirus (BRV) infection induced by a BRV VP8* produced in plants using a TMV-based vector.** *Arch Virol* 2004, **149**(12):2337-2348.
22. O'Neal CM, Crawford SE, Estes MK, Conner ME: **Rotavirus virus-like particles administered mucosally induce protective immunity.** *J Virol* 1997, **71**(11):8707-8717.
23. Parez N, Fourgeux C, Mohamed A, Dubuquoy C, Pillot M, Dehee A, Charpilienne A, Poncet D, Schwartz-Cornil I, Garbarg-Chenon A: **Rectal immunization with rotavirus virus-like particles induces systemic and mucosal humoral immune responses and protects mice against rotavirus infection.** *J Virol* 2006, **80**(4):1752-1761.
24. Ciarlet M, Crawford SE, Barone C, Bertolotti-Ciarlet A, Ramig RF, Estes MK, Conner ME: **Subunit rotavirus vaccine administered parenterally to rabbits induces active protective immunity.** *J Virol* 1998, **72**(11):9233-9246.
25. McNeal MM, Rae MN, Conner ME, Ward RL: **Stimulation of local immunity and protection in mice by intramuscular immunization with triple- or double-layered rotavirus particles and QS-21.** *Virology* 1998, **243**(1):158-166.
26. O'Neal CM, Clements JD, Estes MK, Conner ME: **Rotavirus 2/6 virus-like particles administered intranasally with cholera toxin, *Escherichia coli* heat-labile toxin (LT), and LT-R192G induce protection from rotavirus challenge.** *J Virol* 1998, **72**(4):3390-3393.
27. Yuan L, Geyer A, Hodgins DC, Fan Z, Qian Y, Chang KO, Crawford SE, Parreno V, Ward LA, Estes MK *et al*: **Intranasal administration of 2/6-rotavirus-like particles with mutant *Escherichia coli* heat-labile toxin (LT-R192G) induces antibody-secreting cell responses but not protective immunity in gnotobiotic pigs.** *J Virol* 2000, **74**(19):8843-8853.
28. Yuan L, Saif LJ: **Induction of mucosal immune responses and protection against enteric viruses: rotavirus infection of gnotobiotic pigs as a model.** *Vet Immunol Immunopathol* 2002, **87**(3-4):147-160.

29. Conner ME, Crawford SE, Barone C, O'Neal C, Zhou YJ, Fernandez F, Parwani A, Saif LJ, Cohen J, Estes MK: **Rotavirus subunit vaccines.** *Arch Virol Suppl* 1996, **12**:199-206.
30. Jiang B, Estes MK, Barone C, Barniak V, O'Neal CM, Ottaiano A, Madore HP, Conner ME: **Heterotypic protection from rotavirus infection in mice vaccinated with virus-like particles.** *Vaccine* 1999, **17**(7-8):1005-1013.
31. Coste A, Sirard JC, Johansen K, Cohen J, Kraehenbuhl JP: **Nasal immunization of mice with virus-like particles protects offspring against rotavirus diarrhea.** *J Virol* 2000, **74**(19):8966-8971.
32. Mena JA, Ramírez OT, Palomares LA: **Intracellular distribution of rotavirus structural proteins and virus-like particles expressed in the insect cell-baculovirus system.** *J Biotech* 2006, **122**(4):443-452.
33. Sudbery PE: **The expression of recombinant proteins in yeasts.** *Curr Opin Biotechnol* 1996, **7**(5):517-524.
34. Lal SK, Tulasiram P, Jameel S: **Expression and characterization of the hepatitis E virus ORF3 protein in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*.** *Gene* 1997, **190**(1):63-67.
35. Griffiths JC, Berrie EL, Holdsworth LN, Moore JP, Harris SJ, Senior JM, Kingsman SM, Kingsman AJ, Adams SE: **Induction of high-titer neutralizing antibodies, using hybrid human immunodeficiency virus V3-Ty virus-like particles in a clinically relevant adjuvant.** *J Virol* 1991, **65**(1):450-456.
36. Sakuragi S, Goto T, Sano K, Morikawa Y: **HIV type 1 Gag virus-like particle budding from spheroplasts of *Saccharomyces cerevisiae*.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**(12):7956-7961.
37. Tsunetsugu-Yokota Y, Morikawa Y, Isogai M, Kawana-Tachikawa A, Odawara T, Nakamura T, Grassi F, Autran B, Iwamoto A: **Yeast-derived human immunodeficiency virus type 1 p55(gag) virus-like particles activate dendritic cells (DCs) and induce perforin expression in Gag-specific CD8(+) T cells by cross-presentation of DCs.** *J Virol* 2003, **77**(19):10250-10259.
38. Xia M, Farkas T, Jiang X: **Norovirus capsid protein expressed in yeast forms virus-like particles and stimulates systemic and mucosal immunity in mice following an oral administration of raw yeast extracts.** *J Med Virol* 2007, **79**(1):74-83.
39. Ioannou XP, Griebel P, Hecker R, Babiuk LA, van Drunen Littel-van den Hurk S: **The immunogenicity and protective efficacy of bovine herpesvirus 1 glycoprotein D plus Emulsigen are increased by formulation with CpG oligodeoxynucleotides.** *J Virol* 2002, **76**(18):9002-9010.
40. Zhu X, Wu S, Letchworth GJ, 3rd: **Yeast-secreted bovine herpesvirus type 1 glycoprotein D has authentic conformational structure and immunogenicity.** *Vaccine* 1997, **15**(6-7):679-688.
41. Gedvilaite A, Frommel C, Sasnauskas K, Micheel B, Ozel M, Behrsing O, Staniulis J, Jandrig B, Scherneck S, Ulrich R: **Formation of immunogenic virus-like particles by inserting epitopes into surface-exposed regions of hamster polyomavirus major capsid protein.** *Virol* 2000, **273**(1):21-35.
42. Sasnauskas K, Bulavaite A, Hale A, Jin L, Knowles WA, Gedvilaite A, Dargeviciute A, Bartkeviciute D, Zvirbliene A, Staniulis J *et al*: **Generation of recombinant virus-like particles of human and non-human polyomaviruses in yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** *Intervirology* 2002, **45**(4-6):308-317.
43. Lundblad V: **Yeast cloning vectors and genes.** *Curr Protoc Mol Biol* 2001, **Chapter 13**:Unit13 14.

44. Taxis C, Knop M: **System of centromeric, episomal, and integrative vectors based on drug resistance markers for *Saccharomyces cerevisiae*.** *Biotechniques* 2006, **40**(1):73-78.
45. Denis CL, Ferguson J, Young ET: **mRNA levels for the fermentative alcohol dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae* decrease upon growth on a nonfermentable carbon source.** *J Biol Chem* 1983, **258**(2):1165-1171.
46. Ruohonen L, Aalto MK, Keranen S: **Modifications to the ADH1 promoter of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient production of heterologous proteins.** *J Biotechnol* 1995, **39**(3):193-203.
47. Butt TR, Sternberg EJ, Gorman JA, Clark P, Hamer D, Rosenberg M, Crooke ST: **Copper metallothionein of yeast, structure of the gene, and regulation of expression.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984, **81**(11):3332-3336.
48. Verduyn C, Zomerdijk TPL, Dijken JP, Scheffers WA: **Continuous measurement of ethanol production by aerobic yeast suspensions with an enzyme electrode.** *Applied Microb Biotechnol* 1984, **19**(3):181-185.
49. Otterstedt K, Larsson C, Bill RM, Stahlberg A, Boles E, Hohmann S, Gustafsson L: **Switching the mode of metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** *EMBO Rep* 2004, **5**(5):532-537.
50. Kappeli O: **Regulation of carbon metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* and related yeasts.** *Adv Microb Physiol* 1986, **28**:181-209.
51. Pham HTB, Larsson G, Enfors S-O: **Growth and energy metabolism in aerobic fed-batch cultures of *Saccharomyces cerevisiae*: Simulation and model verification.** *Biotechnol Bioeng* 1998, **60**(4):474-482.
52. Postma E, Verduyn C, Scheffers WA, Van Dijken JP: **Enzymic analysis of the crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*.** *Appl Environ Microbiol* 1989, **55**(2):468-477.
53. Coppella SJ, Dhurjati P: **A mathematical description of recombinant yeast.** *Biotechnol Bioeng* 1990, **35**(4):356-374.
54. Miyasaka H: **The positive relationship between codon usage bias and translation initiation AUG context in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Yeast* 1999, **15**(8):633-637.
55. Zeng CQY, Estes MK, Charpilienne A, Cohen J: **The N terminus of rotavirus VP2 is necessary for encapsidation of VP1 and VP3.** *J Virol* 1998, **72**(1):201-208.
56. Mascorro-Gallardo JO, Covarrubias AA, Gaxiola R: **Construction of a CUP1 promoter-based vector to modulate gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Gene* 1996, **172**(1):169-170.
57. Partow S, Siewers V, Bjorn S, Nielsen J, Maury J: **Characterization of different promoters for designing a new expression vector in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Yeast* 2010, **27**:955-964.
58. Gietz RD, Schiestl RH: **High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method.** *Nat Protoc* 2007, **2**(1):31-34.
59. Dynesen J, Smits HP, Olsson L, Nielsen J: **Carbon catabolite repression of invertase during batch cultivations of *Saccharomyces cerevisiae*: the role of glucose, fructose, and mannose.** *Appl Microbiol Biotechnol* 1998, **50**(5):579-582.
60. Atkin AL: **Preparation of yeast cells for confocal microscopy.** *Methods Mol Biol* 1999, **122**:131-139.
61. Raghava GP, Joshi AK, Agrewala JN: **Calculation of antibody and antigen concentrations from ELISA data using a graphical method.** *J Immunol Methods* 1992, **153**(1-2):263-264.
62. Gorgens JF, van Zyl WH, Knoetze JH, Hahn-Hagerdal B: **Amino acid supplementation improves heterologous protein production by**

- Saccharomyces cerevisiae* in defined medium.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2005, **67**(5):684-691.
63. Hahn-Hagerdal B, Karhumaa K, Larsson CU, Gorwa-Grauslund M, Gorgens J, van Zyl WH: **Role of cultivation media in the development of yeast strains for large scale industrial use.** *Microb Cell Fact* 2005, **4**:31.
64. Tu BP, Mohler RE, Liu JC, Dombek KM, Young ET, Synovec RE, McKnight SL: **Cyclic changes in metabolic state during the life of a yeast cell.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**(43):16886-16891.
65. Blank HM, Gajjar S, Belyanin A, Polymenis M: **Sulfur metabolism actively promotes initiation of cell division in yeast.** *PLoS One* 2009, **4**(11):e8018.
66. Regenbergh B, Grotkjaer T, Winther O, Fausboll A, Akesson M, Bro C, Hansen LK, Brunak S, Nielsen J: **Growth-rate regulated genes have profound impact on interpretation of transcriptome profiling in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Genome Biol* 2006, **7**(11):R107.
67. Luedeking R, Piret EL: **A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH.** *J Biochem Microbiol Technol Eng* 1959, **1**(4):393-412.
68. Gimenez JA, Monkovic DD, Dekleva ML: **Identification and monitoring of protease activity in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*.** *Biotechnol Bioeng* 2000, **67**(2):245-251.
69. Porro D, Sauer M, Branduardi P, Mattanovich D: **Recombinant protein production in yeasts.** *Mol Biotechnol* 2005, **31**(3):245-259.
70. Castro-Acosta RM, Revilla AL, Ramirez OT, Palomares LA: **Separation and quantification of double and triple-layered rotavirus-like particles by CZE.** *Electrophoresis* 2010, **31**(8):1376-1381.
71. McCarthy MP, White WI, Palmer-Hill F, Koenig S, Suzich JA: **Quantitative disassembly and reassembly of human papillomavirus type 11 virus-like particles in vitro.** *J Virol* 1998, **72**(1):32-41.
72. Mach H, Volkin DB, Troutman RD, Wang B, Luo Z, Jansen KU, Shi L: **Disassembly and reassembly of yeast-derived recombinant human papillomavirus virus-like particles (HPV VLPs).** *J Pharm Sci* 2006, **95**(10):2195-2206.
73. Shi L, Sings HL, Bryan JT, Wang B, Wang Y, Mach H, Kosinski M, Washabaugh MW, Sitrin R, Barr E: **GARDASIL: prophylactic human papillomavirus vaccine development--from bench top to bed-side.** *Clin Pharmacol Ther* 2007, **81**(2):259-264.
74. Ward RL, McNeal MM, Sheridan JF: **Development of an adult mouse model for studies on protection against rotavirus.** *J Virol* 1990, **64**(10):5070-5075.
75. Esquivel FR, Lopez S, Gutierrez XL, Arias C: **The internal rotavirus protein VP6 primes for an enhanced neutralizing antibody response.** *Arch Virol* 2000, **145**(4):813-825.
76. Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, Speed TP: **Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data.** *Biostatistics* 2003, **4**(2):249-264.
77. Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP: **A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias.** *Bioinformatics* 2003, **19**(2):185-193.
78. Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, Cope LM, Hobbs B, Speed TP: **Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data.** *Nucleic Acids Res* 2003, **31**(4):e15.
79. Eden E, Navon R, Steinfeld I, Lipson D, Yakhini Z: **GOrilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists.** *BMC Bioinformatics* 2009, **10**:48.

80. Harbison CT, Gordon DB, Lee TI, Rinaldi NJ, Macisaac KD, Danford TW, Hannett NM, Tagne JB, Reynolds DB, Yoo J *et al*: **Transcriptional regulatory code of a eukaryotic genome**. *Nature* 2004, **431**(7004):99-104.
81. Blaiseau PL, Thomas D: **Multiple transcriptional activation complexes tether the yeast activator Met4 to DNA**. *EMBO J* 1998, **17**(21):6327-6336.
82. Lafaye A, Junot C, Pereira Y, Lagniel G, Tabet JC, Ezan E, Labarre J: **Combined proteome and metabolite-profiling analyses reveal surprising insights into yeast sulfur metabolism**. *J Biol Chem* 2005, **280**(26):24723-24730.

ANEXOS

ANEXO A.

Datos de las cinéticas del diseño experimental 2³

	Experimento 9		Experimento 10		Experimento 11		Experimento 12	
Tiempo (h)	Biomasa gDCW/L	Glucosa g/L	Biomasa gDCW/L	Glucosa g/L	Biomasa gDCW/L	Glucosa g/L	Biomasa gDCW/L	Glucosa g/L
0	0.11	19.757	0.14	19.98	0.04	21.35	0.03	22.31
2	0.09	18.991	0.08	20.95	0.07	21.33	0.07	20.50
4	0.15	18.122	0.14	20.19	0.14	20.62	0.14	18.11
6	0.66	16.982	0.69	17.41	0.59	18.26	0.59	17.37
8	0.70	14.253	0.83	16.16	0.68	16.30	0.70	14.24
10	1.31	12.406	0.83	12.58	0.80	10.42	1.14	12.96
12	1.55	5.285	1.22	8.87	1.14	9.65	1.54	10.08
14	1.85	2.099	1.63	6.70	1.60	7.02	1.66	7.51
16	2.19	0.109	1.73	2.15	1.90	2.44	1.51	3.11
18	2.07	0.000	1.90	0.07	1.83	0.02	1.60	0.83
22	2.83	0.000	2.19	0.00	2.24	0.00	2.24	0
24	2.54	0.000	2.01	0.00	2.06	0.00	2.39	0
28	2.75	0.000	2.22	0.00	2.17	0.00	2.14	0

	Experimento 13		Experimento 14		Experimento 15		Experimento 16	
Tiempo (h)	Biomasa gDCW/L	Glucosa g/L	Biomasa gDCW/L	Glucosa g/L	Biomasa gDCW/L	Glucosa g/L	Biomasa gDCW/L	Glucosa g/L
0	0.04	21.54	0.03	20.37	0.03	22.12	0.03	19.62
2	0.08	21.02	0.08	21.17	0.06	21.43	0.08	19.45
4	0.15	19.21	0.15	20.35	0.15	16.08	0.15	17.52
6	0.59	19.16	0.77	16.42	0.90	14.55	0.73	16.16
8	0.82	15.14	1.27	13.19	0.82	12.21	0.89	15.57
10	1.23	12.34	1.50	11.80	1.24	10.37	1.24	11.90
12	1.99	6.73	1.80	7.88	1.50	7.81	1.70	7.45
14	1.97	4.28	1.81	4.86	1.90	5.72	1.86	4.50
16	2.15	0.79	2.72	0.59	2.11	0.99	1.94	1.13
18	2.16	0.33	2.23	0.00	2.05	0.00	2.08	0.00
22	2.38	0	2.56	0	2.26	0	2.14	0.00
24	2.60	0	2.50	0	2.31	0	2.38	0.00
28	2.57	0	2.47	0	2.07	0	2.49	0.00

Anexo B.1

Datos de biomasa y metabolitos de los cultivos por lote

PD.U-6 (Valores promedio de tres cultivos independientes)

Tiempo	Biomasa (gDCW/L)	Glucosa (g/L)	Glicerol (g/L)	Acetato (g/L)	Etanol (g/L)	Succinato (g/L)	Piruvato (g/L)
0:00:00	0.00	20.89	1.38	0.00	0.22	0.00	0.00
11:30:00	0.06						
13:30:00	0.29	17.98	1.35	0.05	1.28	0.00	0.02
15:30:00	0.76	15.65	1.41	0.13	2.12	0.00	0.02
17:30:00	0.89	13.15	1.45	0.20	2.81	0.01	0.03
19:30:00	1.39	9.23	1.59	0.31	3.99	0.02	0.05
21:30:00	1.69	8.03	1.66	0.35	4.09	0.03	0.05
23:30:00	2.12						
25:30:00	2.58	1.48	1.76	0.56	5.87	0.02	0.07
30:00:00	2.82	0.01	1.77	0.81	5.30	0.03	0.02
36:45:00	3.22	0.01	1.68	0.52	3.62	0.18	0.00

CEN.U-6 (Valores promedio de tres cultivos independientes)

Tiempo	Biomasa (gDCW/L)	Glucosa (g/L)	Glicerol (g/L)	Acetato (g/L)	Etanol (g/L)	Succinato (g/L)	Piruvato (g/L)
0:00:00	0.00	21.00	0.00	0.00	0.52	0.00	0.00
12:15:00	0.01	20.00					
14:15:00	0.19	19.43	1.44	0.02	1.12	0.01	0.02
16:15:00	0.28	17.59	1.61	0.04	1.79	0.01	0.03
18:15:00	0.62	13.75	1.73	0.06	2.54	0.02	0.04
20:15:00	1.03	10.89	1.92	0.10	4.10	0.04	0.07
22:15:00	1.28	7.13	2.48	0.14	5.69	0.04	0.09
24:15:00	1.54	1.00					
26:15:00	1.77	0.01	2.77	0.19	7.97	0.05	0.13
30:15:00	1.74	0.00	2.87	0.22	6.85	0.07	0.13
34:15:00	1.66	0.00	2.78	0.22	6.30	0.09	0.13

PD.U-C (Valores promedio de tres cultivos independientes)

Tiempo	Biomasa (gDCW/L)	Glucosa (g/L)	Glicerol (g/L)	Acetato (g/L)	Etanol (g/L)	Succinato (g/L)	Piruvato (g/L)
0:00:00	0.00	21.31	1.48	0.00	0.24	0.00	0.00
11:30:00	0.14						
13:30:00	0.41	17.21	1.55	0.07	1.65	0.00	0.02
15:30:00	0.91	14.29	1.48	0.16	2.59	0.00	0.03
17:30:00	1.42	11.50	1.56	0.23	3.39	0.01	0.04
19:30:00	1.72	8.10	1.63	0.33	4.35	0.04	0.05
21:30:00	2.14	5.19	1.81	0.45	4.73	0.01	0.05
23:30:00	2.33						
25:30:00	2.74	0.31	1.80	0.73	5.99	0.00	0.06
30:00:00	2.86	0.01	1.77	0.94	5.07	0.00	0.01
36:45:00	3.35	0.01	1.69	0.54	3.09	0.11	0.00

CEN.U-C (Valores promedio de tres cultivos independientes)

Tiempo	Biomasa (gDCW/L)	Glucosa (g/L)	Glicerol (g/L)	Acetato (g/L)	Etanol (g/L)	Succinato (g/L)	Piruvato (g/L)
0:00:00	0.00	23.49	0.00	0.00	0.08	0.01	0.01
12:15:00	0.04	20.62	1.54	0.01	0.60	0.01	0.02
14:15:00	0.09	20.28	1.14	0.01	1.05	0.02	0.03
16:15:00	0.35	18.34	1.18	0.04	1.63	0.06	0.04
18:15:00	0.43	15.84	1.43	0.04	2.68	0.06	0.05
20:15:00	0.92	11.47	1.54	0.06	4.16	0.05	0.07
22:15:00	1.21	7.48	1.87	0.08	5.50	0.07	0.10
24:15:00	1.45	2.50	2.51	0.11	7.06	0.08	0.13
26:15:00	1.64	0.02	2.66	0.12	7.69	0.10	0.13
30:15:00	1.65	0.00	2.22	0.14	6.93	0.12	0.13
34:15:00	1.55	0.00	2.73	0.16	6.19	0.12	0.13

Anexo B.2

Datos de biomasa y metabolitos de los cultivos por lote alimentado

PD.U-267 (Valores promedio de tres cultivos independientes)

Tiempo	Biomasa (gDCW/L)	Glucosa (g/L)	Glicerol (g/L)	Acetato (g/L)	Etanol (g/L)	Succinato (g/L)	Piruvato (g/L)
0:00:00	0.00	5.83	0.06	0.00	0.10	6.42	0.00
9:45:00	0.00	5.40	1.46	0.00	0.29	6.60	0.00
12:00:00	0.14	4.37	1.45	0.04	0.62	6.62	0.01
16:00:00	0.93	2.38	1.76	0.15	1.71	6.58	0.02
20:00:00	2.48	4.41	1.77	0.13	3.19	6.37	0.06
24:00:00	4.17	10.78	2.17	0.18	5.16	5.95	0.12
28:00:00	6.13	25.17	3.09	0.27	8.06	5.03	0.25
32:00:00	7.22	47.76	4.37	0.78	10.86	3.81	0.41
36:00:00	8.26	58.62	6.09	1.36	15.01	2.87	0.51

PD.U-6 (Valores promedio de tres cultivos independientes)

Tiempo	Biomasa (gDCW/L)	Glucosa (g/L)	Glicerol (g/L)	Acetato (g/L)	Etanol (g/L)	Succinato (g/L)	Piruvato (g/L)
0:00:00	0.00	5.76	0.04	0.00	0.02	6.28	0.00
9:45:00	0.00	5.40	1.63	0.00	0.21	6.44	0.00
12:00:00	0.13	4.56	1.49	0.07	0.50	6.50	0.01
16:00:00	0.82	2.71	1.64	0.15	1.70	6.49	0.02
20:00:00	2.31	3.89	1.85	0.15	3.56	6.28	0.07
24:00:00	3.98	9.52	2.28	0.19	5.78	5.88	0.14
28:00:00	5.92	23.68	2.95	0.29	8.76	4.96	0.28
32:00:00	6.88	47.07	4.15	0.68	11.39	3.74	0.43
36:00:00	7.75	58.57	5.70	1.26	15.29	2.85	0.53

PJ.U-267 (Valores promedio de tres cultivos independientes)

Tiempo	Biomasa (gDCW/L)	Glucosa (g/L)	Glicerol (g/L)	Acetato (g/L)	Etanol (g/L)	Succinato (g/L)	Piruvato (g/L)
0:00:00	0.00	6.27	0.07	0.00	0.00	6.73	0.00
14:00:00	0.11	4.94	1.77	0.00	0.47	6.63	0.01
18:00:00	0.43	2.40	1.70	0.03	1.31	6.90	0.03
22:00:00	0.72	2.84	1.75	0.06	1.55	6.95	0.03
26:00:00	1.08	10.76	1.88	0.21	2.14	6.64	0.05
30:00:00	1.61	25.16	1.80	0.37	3.43	5.73	0.09
34:00:00	2.43	52.41	2.06	0.62	5.98	5.02	0.15
38:20:00	2.94	73.27	2.54	0.96	9.12	3.58	0.25
43:00:00	4.01	75.78	3.92	1.46	14.58	3.13	0.37
63:00:00	7.14	0.04	10.62	3.40	30.25	3.55	1.09

PJ.U-6 (Valores promedio de tres cultivos independientes)

Tiempo	Biomasa (gDCW/L)	Glucosa (g/L)	Glicerol (g/L)	Acetato (g/L)	Etanol (g/L)	Succinato (g/L)	Piruvato (g/L)
0:00:00	0.00	6.46	0.06	0.00	0.01	6.78	0.00
14:00:00	0.23	3.89	1.62	0.00	0.94	6.71	0.02
18:00:00	0.55	1.06	1.88	0.04	1.74	6.80	0.03
22:00:00	0.84	1.20	1.65	0.08	1.84	6.89	0.04
26:00:00	1.07	8.72	1.83	0.22	2.48	6.64	0.06
30:00:00	1.69	24.59	2.05	0.38	3.99	5.97	0.10
34:00:00	2.35	49.30	2.19	0.58	6.27	4.87	0.16
38:20:00	2.84	73.34	3.33	0.90	9.86	3.53	0.24
43:00:00	4.12	82.06	3.93	1.41	15.75	2.86	0.36
63:00:00	6.69	0.10	11.31	3.49	36.41	3.31	0.40

ANEXO C.

ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE CEPAS DE *Saccharomyces cerevisiae* PRODUCTORAS DE VP6

C.1 Materiales y métodos

Se muestrearon los cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* en fase media logarítmica, usando como criterio un valor de densidad óptica DO_{600} entre 1.2 y 1.4. El RNA total de las muestras se extrajo utilizando el kit RNAeasy mini (QIAGEN, Chatsworth, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se analizaron las cepas PD.U-C, PD.U-6, CEN.U-C y CEN.U-6. Cada condición se analizó por triplicado en cultivos independientes, en fermentadores de 1 L. Estos 12 cultivos fueron analizados utilizando los microarreglos Affymetrix Yeast genome 2.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) y preparando las muestras para hibridización, utilizando el kit GeneChip® 3' IVT Express (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA), siguiendo las recomendaciones del fabricante. La calidad del RNA total, cDNA, aRNA y aRNA fragmentado fue determinada usando el BioAnalyzer 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA).

El análisis estadístico de datos se realizó utilizando el software R Versión 2.11.1 (www.r-project.org) y el *script* desarrollado por el grupo de biología de sistemas de Chalmers University of Technology. Este *script* permite realizar la normalización de datos con el método RMA (Robust Multi-Array), el cual incluye un ajuste del *background*, una normalización cuantil y un resumen de los p-valores del \log_2FC [76-78], así como un análisis de datos multivariable que utiliza PCA (análisis de componentes principales) y permite observar de manera gráfica las relaciones estadísticas entre muestras de diferentes grupos, así como relaciones entre las diferentes variables analizadas.

También se utilizó la herramienta “Reporter features” de BioMet ToolBox, disponible en www.sysbio.se y que permite el análisis de factores transcripcionales asociados a los genes que presentan los mayores cambios en la expresión en las diferentes condiciones analizadas.

Después del análisis estadístico se analizaron los resultados de salida y se compararon con los genes anotados en la base de datos para *Saccharomyces cerevisiae* (www.yeastgenome.org). Se realizó un análisis de “ontología de genes” o GO que permite realizar análisis de un grupo de genes, asociando su función celular. Para mostrar de manera gráfica los resultados obtenidos, se utilizó la aplicación GOrilla [79] y diagramas de Venn convencionales que permiten evidenciar los genes variables en cada ensayo.

C.2 Resultados

C.2.1 Cultivos en fermentador para análisis de transcriptoma

Se analizaron 4 cepas diferentes en cultivos por lote a nivel de 1L, todos los análisis se hicieron por triplicado (12 cultivos). El tiempo de muestreo se estableció de acuerdo a los resultados de DO_{600} . En la figura C.1. se muestra un esquema del tiempo de muestreo para las cepas CEN.U.

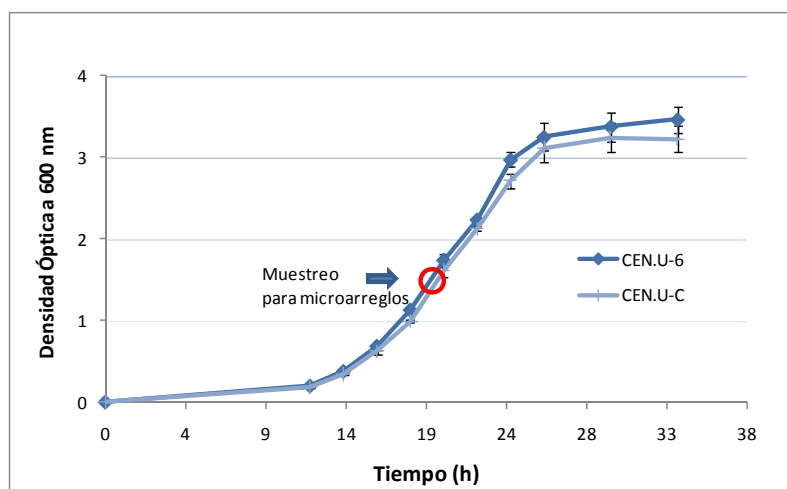


Figura C.1. Cinética de producción de biomasa en el que se esquematiza el tiempo de muestreo para los microarreglos. Se muestran como ejemplo los cultivos de la cepa CEN.U.

Las cinéticas de producción de biomasa revelaron un mejor aprovechamiento de la glucosa por parte de las cepas PD.U (Figura C.2.A) para producción de biomasa. Aunque los valores de velocidad específica máxima de crecimiento (μ_{max}) no fueron muy diferentes

entre las cepas, estos disminuyeron en las cepas que expresan la proteína VP6 (Figura C.2.B).

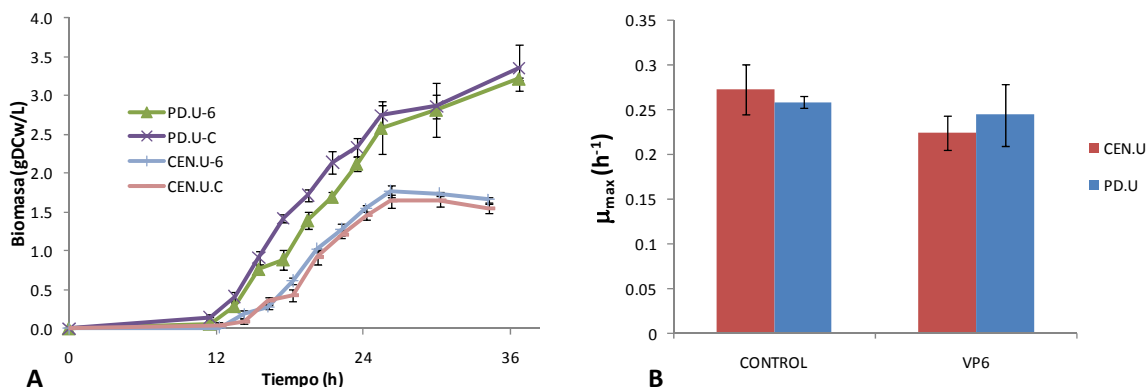


Figura C.2.A. Cinética de crecimiento para las 4 cepas del análisis de transcriptoma. **C.2.B.** Valores de μ_{\max} para cada cepa. Las barras de error representan la desviación estándar de los tres experimentos.

Con respecto a la producción de proteína heteróloga, se observa que los valores de proteína alcanzados por la cepa PD.U-6 son mayores en comparación con los valores obtenidos para la cepa CEN.U-6. Esta diferencia está asociada a la mayor producción de biomasa y a un mayor rendimiento biomasa producto de la cepa PD.U-6. La disminución de los valores de proteína después de la hora 28 para la cepa CEN.U-6 sugiere una degradación del producto por acción de proteasas intracelulares, cuando la glucosa se había consumido completamente. Las cinéticas de producción de proteína así como el rendimiento biomasa-producto $Y_{P/X}$ se muestran a continuación:

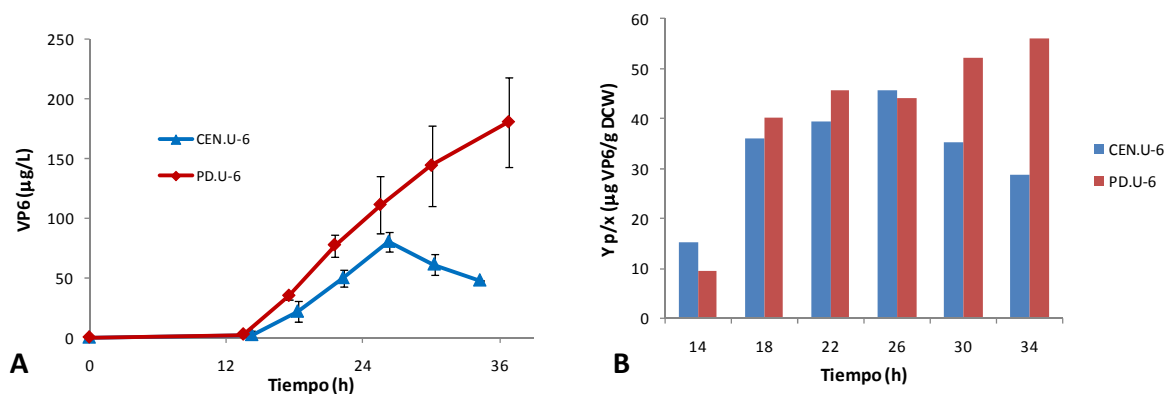


Figura C.3.A. Cinética de producción de VP6 para las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* PD.U-6 y CEN.U-6, en cultivos por lote. **C.3.B.** Rendimiento específico biomasa producto a lo largo de los cultivos.

C.2.2 Análisis de transcriptoma

Las muestras de biomasa de los doce cultivos descritos anteriormente fueron procesadas tal y como se explicó en materiales y métodos de este anexo. La calidad del RNA en las diferentes etapas fue verificada usando el Bioanalyzer 2100 (datos no mostrados). Al leer los microarreglos se obtuvieron archivos con extensión .CEL que contienen los datos de intensidad de cada uno de los genes incluidos en el YeastGenome 2.0 Microarray de affymetrix. El análisis estadístico de datos arrojó los siguientes resultados en cada etapa de análisis:

Normalización

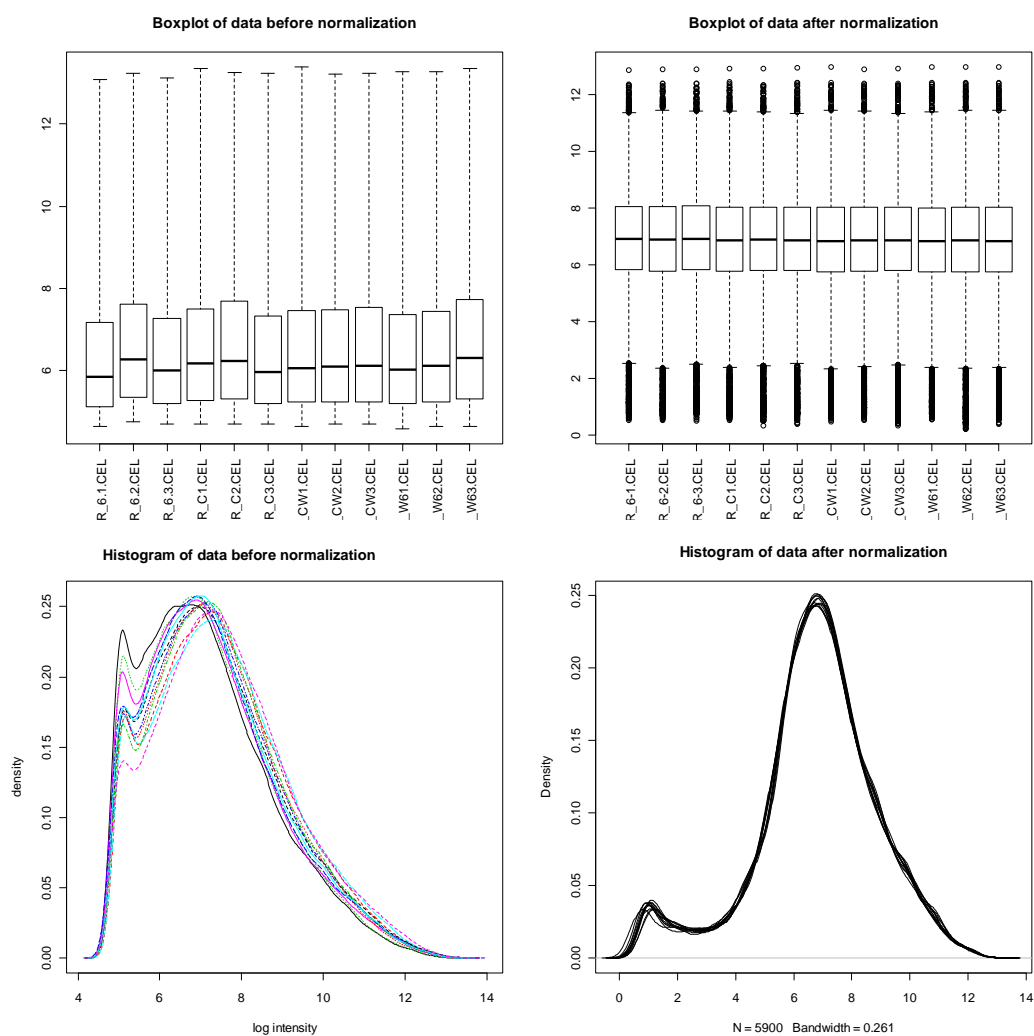


Figura C.4. Esquema de la normalización de datos de los doce microarreglos analizados, se muestran los valores de antes y después de normalizar expresados en gráficos de densidad y *Boxplot*.

Tabla C.1. Valores de FC para los ensayos entre la cepa PD.U-6 y PD.U-C. Los valores anotados en casillas verdes corresponden a los genes asociados al metabolismo de azufre. Los valores de Log FC muestran que los niveles de expresión son inferiores en la cepa que expresa VP6 que en la cepa control. La validez de los resultados se soporta con los la alta reproducibilidad entre ensayos paralelos (valor p <0.01).

ID	Gene Name	Systematic	logFC	AveExpr	t	P.Value	adj.P.Val	B	OBSERVATIONS
228	1769750_at	MET32	YDR253C	-3.02932	6.028534715	-11.1993	7.21E-06	0.006331337	4.318468 Zinc-finger DNA-binding protein, involved in transcriptional regulation of the methionine biosynthetic genes, similar to Met31p
1969	1773135_at	LEE1	YPL054W	-1.30633	7.06395306	-10.9217	8.58E-06	0.006331337	4.17082 Zinc-finger protein of unknown function
3293	1775663_at	MET5	YJR137C	-2.73451	8.804819823	-11.1878	7.26E-06	0.006331337	4.312425 Sulfite reductase beta subunit, involved in amino acid biosynthesis, transcription repressed by methionine
3348	1775757_at	RAD59	YDL059C	-2.37702	6.728006616	-12.6375	3.10E-06	0.006331337	5.008472 Protein involved in the repair of double-strand breaks in DNA during vegetative growth via recombination and single-strand annealing
4230	1777421_at	RMD6	YEL072W	-1.76738	6.08666942	-11.949	4.59E-06	0.006331337	4.692972 Protein required for sporulation
4729	1778359_at	SAM1	YLR180W	-1.71016	9.56859585	-11.9925	4.47E-06	0.006331337	4.713671 S-adenosylmethionine synthetase, catalyzes transfer of the adenosyl group of ATP to the sulfur atom of methionine
5532	1779892_at	MET16	YPR167C	-2.20092	8.139723936	-11.1036	7.65E-06	0.006331337	4.268121 3'-phosphoadenylsulfate reductase, involved in sulfate assimilation and methionine metabolism
5674	1780163_at	MET28	YIR017C	-2.1429	7.792815285	-10.925	8.57E-06	0.006331337	4.172612 Basic leucine zipper (bZIP) transcriptional activator in the Cbf1p-Met4p-Met28p complex, for the regulation of sulfur metabolism
358	1769997_at	SEO1	YAL067C	-4.86357	6.78018947	-9.73529	1.90E-05	0.009104884	3.479153 Putative permease; mutation confers resistance to ethionine sulfoxide
1509	1772232_at	YLR179C	YLR179C	-0.86308	9.327858497	-9.84133	1.76E-05	0.009104884	3.545276 Protein of unknown function with similarity to Tfs1p
1877	1772959_at	MET8	YBR213W	-2.43057	7.797379698	-10.0515	1.52E-05	0.009104884	3.673751 Bifunctional dehydrogenase and ferredoxin, required for sulfate assimilation and methionine biosynthesis
2212	1773600_at	SER33	YIL074C	-1.85391	9.06768602	-10.0062	1.57E-05	0.009104884	3.646353 3-phosphoglycerate dehydrogenase, catalyzes the first step in serine and glycine biosynthesis
2626	1774365_at	MET14	YKLO01C	-2.38411	9.422102544	-9.65668	2.01E-05	0.009104884	3.429551 Adenylsulfate kinase, required for sulfate assimilation and involved in methionine metabolism
5278	1779413_at	MET2	YNL277W	-2.94966	7.906001038	-9.47647	2.28E-05	0.009616554	3.313937 L-homoserine-O-acetyltransferase, catalyzes the first step of the methionine biosynthetic pathway
4868	1778632_at	MET1	YKR069W	-2.87777	7.469040156	-9.08872	3.03E-05	0.011928317	3.055879 S-adenosyl-L-methionine uroporphyrinogen III methyltransferase; required for sulfate assimilation and methionine biosynthesis
2263	1773675_at	MXR1	YER042W	-1.83027	9.076903912	-8.82646	3.70E-05	0.013635966	2.873803 Methionine-S-sulfoxide reductase, involved in the response to oxidative stress;
2867	1774859_at	MET6	YER091C	-0.67003	11.52138259	-8.7395	3.95E-05	0.013721353	2.812039 Cobalamin-independent methionine synthase, involved in methionine biosynthesis and regeneration
2923	1774952_at	SUL2	YLR092W	-3.3295	7.12898547	-8.51259	4.72E-05	0.015470685	2.647508 High affinity sulfate permease; sulfate uptake is mediated by specific sulfate transporters Sul1p and Sul2p
2161	1773498_at	MET3	YJR010W	-3.26969	8.727673261	-8.21421	5.99E-05	0.018614722	2.423477 ATP sulfurylase, catalyzes the primary step of intracellular sulfate activation, essential for assimilatory reduction of sulfate to sulfide
3221	1775526_at	CYS4	YGR155W	-1.05074	10.03278542	-8.00863	7.10E-05	0.019941569	2.26385 Cystathionine beta-synthase, catalyzes synthesis of cystathionine from serine and homocysteine
3804	1776630_at	GTO1	YGR154C	-1.73408	6.462730255	-8.04572	6.88E-05	0.019941569	2.292978 Omega-class glutathione transferase; induced under oxidative stress; putative peroxisomal localization
527	1770319_at	MET10	YFR030W	-2.5558	8.673143685	-7.80272	8.44E-05	0.02074018	2.099497 Subunit alpha of assimilatory sulfite reductase, which converts sulfite into sulfide
2364	1773888_at	CYS3	YAL012W	-1.25553	10.64353301	-7.82438	8.28E-05	0.02074018	2.116998 Cystathionine gamma-lyase, catalyzes one of the two reactions involved in the transsulfuration pathway
5876	RPTR-Sc-J0134/J01347-4		J01347-4	-0.61833	9.311832095	-7.85111	8.10E-05	0.02074018	2.138528
628	1770532_at	MET17	YLR303W	-0.87509	11.03329077	-7.65995	9.53E-05	0.021628908	1.982825 Methionine and cysteine synthase (O-acetyl homoserine-O-acetyl serine sulfhydrylase), required for sulfur amino acid synthesis
707	1770687_at	GRX8	YLR364W	-2.46527	7.031689475	-7.67171	9.44E-05	0.021628908	1.992523 Glutaredoxin that employs a dithiol mechanism of catalysis; monomeric;
2304	1773748_at	MUP3	YHL036W	-1.92793	7.93166476	-7.60878	9.96E-05	0.021648411	1.940464 Low affinity methionine permease, methionine uptake
3048	1775219_at	YHR112C	YHR112C	-1.01752	9.318431741	-7.57321	0.00010274	0.021648411	1.910841 Molecular function: Cystathionine beta-lyase activity; Biological process sulfur metabolic process (annotations)
4214	1777389_at	BSC5	YNR069C	-0.58401	1.395330519	-7.4616	0.00011326	0.023043549	1.816949 Protein of unknown function,
2220	1773613_at	OPT1	YJL212C	-1.94012	5.817894387	-7.32463	0.00012787	0.023210401	1.699769 Proton-coupled oligopeptide transporter of the plasma membrane;involved in sulfur metabolic process (manual)
3131	1775384_at	BNA3	YJL060W	-1.37407	9.576771123	-7.38075	0.00012165	0.023210401	1.748041 Kynurenine aminotransferase, catalyzes formation of kynurenic acid from kynurenine
4037	1777080_at	GSH1	YJL101C	-1.0388	7.476328378	-7.30768	0.00012982	0.023210401	1.685117 Gamma glutamylcysteine synthetase catalyzes the first step in glutathione (GSH) biosynthesis

Para analizar los cambios significativos entre experimentos se analizó el valor FC (*Fold change*) que está dado por la ecuación:

$$FC = \frac{\text{Nivel de expresión experimento}}{\text{Nivel de expresión control}} \quad [C.2]$$

Para ejemplificar de mejor manera el valor de FC, se expresa normalmente como (Log_2 FC), el cual permite presentar de manera gráfica si el gen estaba sobre o sub-regulado. Los valores del Log_2 FC de todos los microarreglos se encuentran en archivos de Excel. En la Tabla C.1 se muestra un ejemplo del tipo de información que se obtuvo.

La anotación de genes se hizo consultando la base de datos SGD. Los valores anotados en casillas verdes corresponden a los genes asociados al metabolismo de azufre. Los valores de Log FC muestran que los niveles de expresión son inferiores en la cepa que expresa VP6 que en la cepa control. La validez de los resultados se soporta con la alta reproducibilidad entre ensayos paralelos (valor $p < 0.01$).

Clustering

Mediante el análisis PCA, se pudieron reducir dimensionalmente los valores, mostrando que los principales componentes están en los grupos 1 y 2 (Figura C.5.A). Al realizar un gráfico de PCA de los dos componentes principales para los doce ensayos se pudo observar una clara separación entre las cepas W3031a y CEN.PK.(Figura C.5.B), lo que demuestra que los valores obtenidos son consistentes con los cambios de expresión entre las cepas y que la reproducibilidad de los resultados es adecuada.

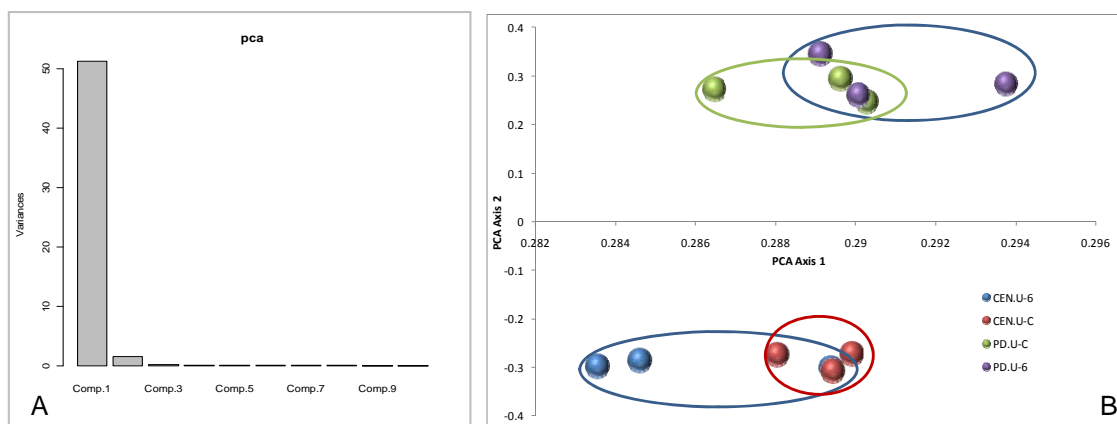


Figura C.5. Clustering de datos. **A.** Análisis de PCA. **B.** Comparación entre los principales componentes de los grupos 1 y 2.

C.2.3 Análisis de factores de transcripción

Con base en los resultados obtenidos y utilizando como base la información de Harbinson, *et al*, 2004 [80], se realizó un análisis de factores de transcripción asociados a los genes con mayores cambios en la expresión, tal y como se explicó materiales y métodos de este anexo. De este análisis se pudo observar que las cepas que expresan VP6 tuvieron cambios importantes en los niveles de expresión de algunos factores transcripcionales asociados a biogénesis de metionina, entre los que se cuentan MET32, MET4, CBF1 y MET31. Los mecanismos de interacción de estos factores transcripcionales fue descrito previamente [81]. A continuación se ilustra una figura de las diferentes formas de regulación de estos complejos:

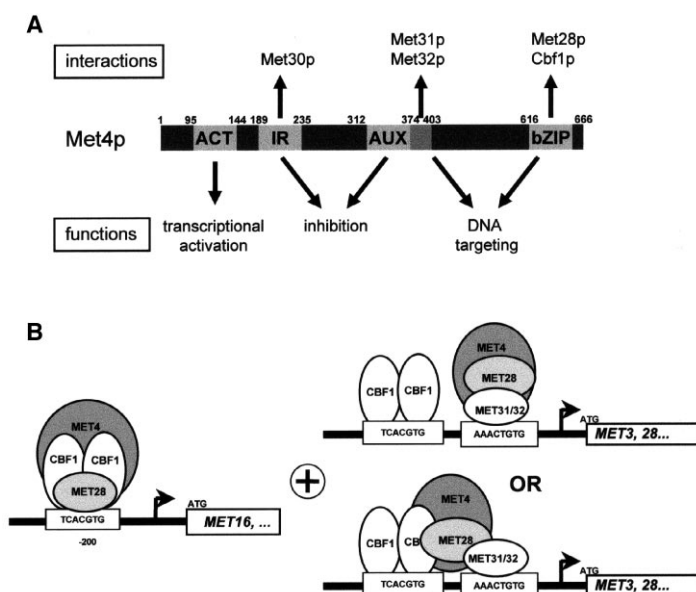


Figura C.6.A. Representación esquemática de la organización funcional de Met4. **C.6.B.** Modalidades de reclutamiento de DNA, dependiendo del tipo de gen MET a regular. Tomado de [81].

C.2.4 Ontología de genes

Para establecer las distintas relaciones entre los genes con diferencias significativas en el valor de Log FC tomando como criterio inicial un p-valor < 0.001, se trataron de evidenciar qué funciones celulares estaban asociadas a los genes con los mayores cambios en la expresión genética. Para ello, se hizo un análisis de los genes cambiantes entre las cepas control (CEN.U-C vs PD.U-C), obteniendo un total de 1196 genes. Al comparar las cepas productoras de VP6 (CEN.U.VP6 vs PD.U-6) se obtuvieron 1495 genes que cumplían las

condiciones del análisis. Luego se hizo un diagrama de Venn de comparación de los genes y se encontró que habían 341 genes solamente asociados a las cepas control, 855 genes que estaban asociados a ambos grupos y 610 genes asociados solamente a las cepas que producían VP6 (Figura C.7). Estos 610 genes fueron utilizados para realizar el análisis de ontología, basándose en su función celular. Los resultados gráficos de este análisis fueron adquiridos mediante la aplicación *GOrilla* [79] y se muestran en la figura C.8. En este diagrama se puede apreciar que la mayoría de genes con cambios en los niveles de expresión están asociados al metabolismo de azufre y a los mecanismos de oxidorreducción (p -valor $<10^{-9}$). Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos al realizar el análisis de factores de transcripción, que muestra la influencia de factores transcripcionales asociados a la biosíntesis de metionina, cisteína y GSM.

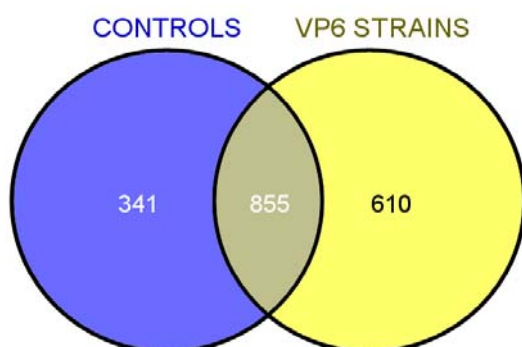


Figura C.7. Diagrama de Venn que esquematiza el número de genes cambiantes en las cepas control Vs. las cepas productoras de VP6. Este diagrama fue generado usando la herramienta Venny disponible en línea.

Al realizar el análisis del transcriptoma de las cepas CEN.U-C vs la PD.U-C se pudo evidenciar una clara sobreexpresión de genes asociados a las riboproteínas de mitocondria (MRPs) para la CEN.U. (Figura C.9). Esto indicaría una mayor actividad mitocondrial, una mayor síntesis de ATP y otras funciones entre las que se cuentan la biosíntesis de ergosterol, la síntesis y desaturación de ácidos grasos y lípidos, movilización de glicógeno y producción de flavonoides. Todo esto concuerda con la aplicación industrial de la cepa parental CEN.PK-113.5D, entre los que se cuentan producción de ácidos grasos, derivados de ergosterol y aromas. Por esta razón, se descartó su utilización para los futuros ensayos de producción de proteínas.

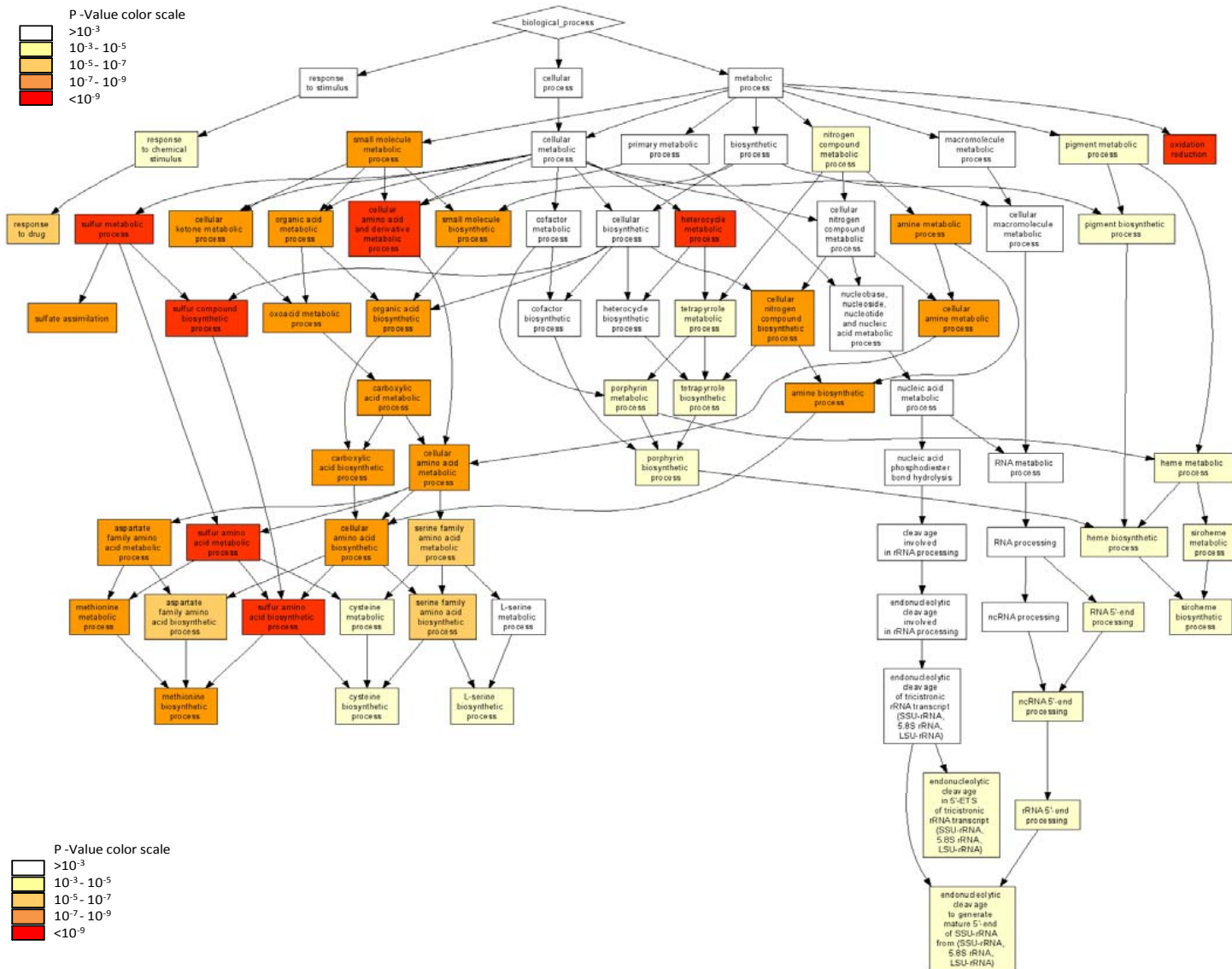


Figura C.8. Análisis de ontología de genes para 610 genes cambiantes en las cepas productoras de VP6

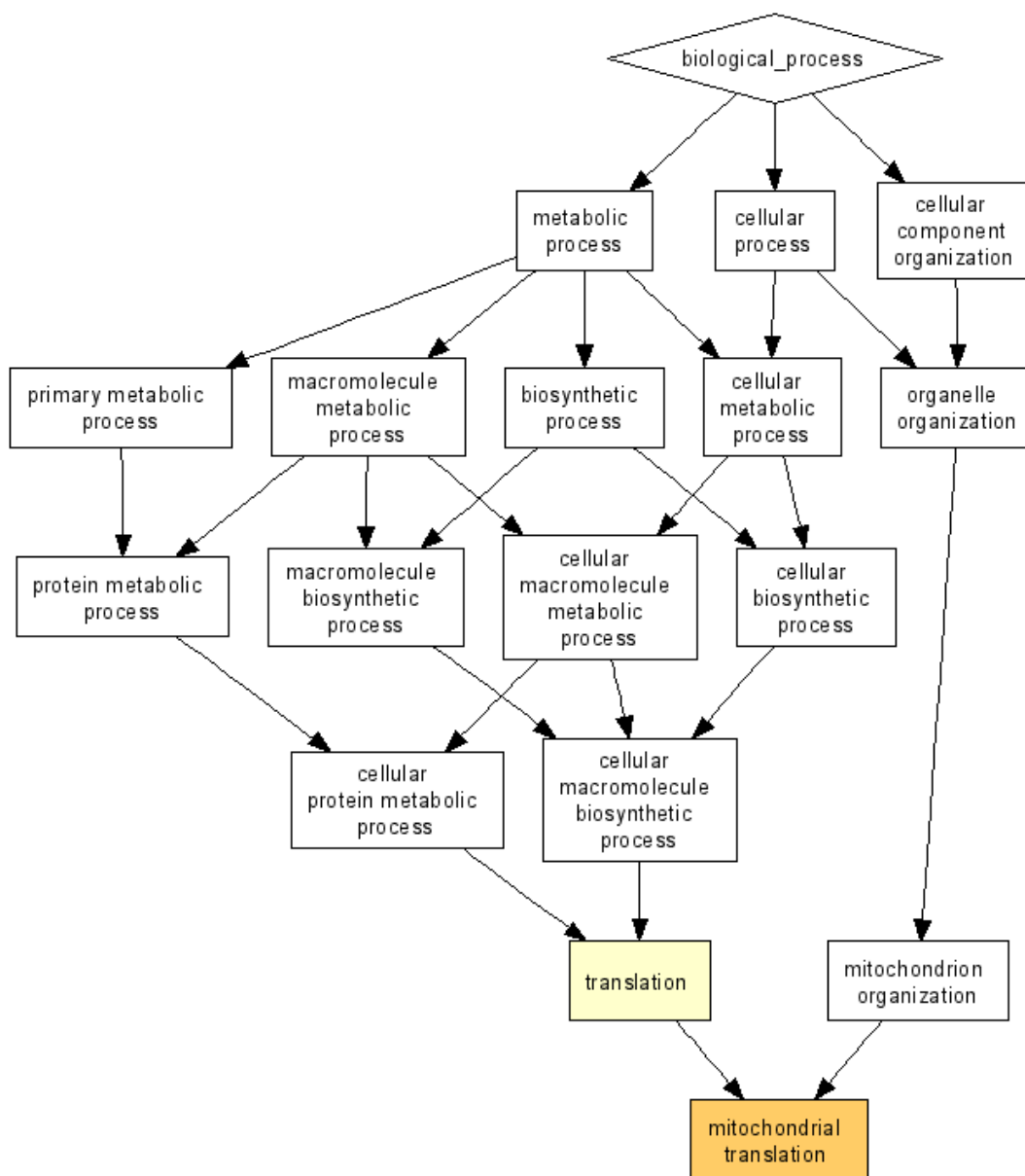


Figura. C.9. Análisis de ontología de genes para los genes cambiantes en las cepas control

Sobre el análisis de transcriptoma para las cepas que expresan VP6 con fondos genéticos distintos, se pudo evidenciar que las cepas que expresaban VP6 mostraban cambios en los niveles de expresión de gran cantidad de los genes asociados al metabolismo de azufre, desde los pasos iniciales de entrada celular hasta las rutas de biosíntesis de metionina, cisteína y glutatión. Estudios recientes sugieren un papel importante del metabolismo de azufre sobre la velocidad de crecimiento de las células y el inicio de la división celular [64-66]. Otros estudios sugieren que la variación en los niveles de

transcritos del metabolismo de azufre puede estar asociada a las respuestas por estrés oxidante o estrés por metales (principalmente Cd^{+2}), redireccionando los metabolitos azufrados hacia la producción de GSH y mostrando una disminución en el contenido de otras proteínas con alto contenido de azufre [82].

En nuestro estudio, la influencia de la producción de VP6 sobre la disminución de la expresión de genes del metabolismo de azufre parece estar asociada a la baja cantidad de aminoácidos azufrados en VP6 y por ende a una menor necesidad de producirlos, así como a la disminución de la división celular, mostrado en valores absolutos como una disminución en el tiempo de duplicación en comparación con las cepas que no expresan la proteína heteróloga (Figura C.2.B).

ANEXO D. Artículo MCF 2011

Rodriguez-Limas WA, Tyo KE, Nielsen J, Ramirez OT, Palomares LA: Molecular and process design for rotavirus-like particle production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Fact.* 10:33.

RESEARCH

Open Access

Molecular and process design for rotavirus-like particle production in *Saccharomyces cerevisiae*

William A Rodríguez-Limas¹, Keith EJ Tyo², Jens Nielsen², Octavio T Ramírez¹ and Laura A Palomares^{1*}

Abstract

Background: Virus-like particles (VLP) have an increasing range of applications including vaccination, drug delivery, diagnostics, gene therapy and nanotechnology. These developments require large quantities of particles that need to be obtained in efficient and economic processes. Production of VLP in yeast is attractive, as it is a low-cost protein producer able to assemble viral structural proteins into VLP. However, to date only single-layered VLP with simple architecture have been produced in this system. In this work, the first steps required for the production of rotavirus-like particles (RLP) in *S. cerevisiae* were implemented and improved, in order to obtain the recombinant protein concentrations required for VLP assembly.

Results: The genes of the rotavirus structural proteins VP2, VP6 and VP7 were cloned in four *Saccharomyces cerevisiae* strains using different plasmid and promoter combinations to express one or three proteins in the same cell. Performance of the best constructs was evaluated in batch and fed-batch cultures using a complete synthetic media supplemented with leucine, glutamate and succinate. The strain used had an important effect on recombinant protein concentration, while the type of plasmid, centromeric (YCp) or episomal (YEp), did not affect protein yields. Fed-batch culture of the PD.U-267 strain resulted in the highest concentration of rotavirus proteins. Volumetric and specific productivities increased 28.5- and 11-fold, respectively, in comparison with batch cultures. Expression of the three rotavirus proteins was confirmed by immunoblotting and RLP were detected using transmission electron microscopy.

Conclusions: We present for the first time the use of yeast as a platform to express multilayered rotavirus-like particles. The present study shows that the combined use of molecular and bioprocess tools allowed the production of triple-layered rotavirus RLP. Production of VLP with complex architecture in yeasts could lead to the development of new vaccine candidates with reduced restrictions by regulatory agencies, using the successful experience with other yeast-based VLP vaccines commercialized worldwide.

Background

Virus-like particles (VLP) are obtained when viral structural proteins are produced in heterologous expression systems in absence of viral genetic material. VLP assemble without the action of non-structural viral proteins and have the same architectural characteristics as native viral particles. The current market demand of VLP is primarily as products for vaccination [1], but other applications include diagnostics, biomedicine, material science and nanotechnology [2,3]. VLP have successfully

protected humans and animals from viral diseases [4], inducing excellent humoral and cellular immune responses [5,6]. To date, a few VLP-based vaccines are currently used for human vaccination worldwide: hepatitis B and human papillomavirus vaccines are commercialized by several pharmaceutical companies. Other VLP-based vaccine candidates are in clinical trials or undergoing preclinical evaluation, such as influenza virus, parvovirus, Norwalk and various chimeric VLP [7,8]. VLP have been expressed in different heterologous systems, from bacteria and yeasts to the insect cell/baculovirus system (IC-BVS) and various mammalian cell lines. Ease of expression, ability to scale up and cost of production have made yeast the most popular VLP expression system [9]. However, to date yeasts have only

* Correspondence: laura@ibt.unam.mx

¹Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Apdo. Postal. 510-3. Cuernavaca, Morelos, CP. 62250, México
Full list of author information is available at the end of the article

been used to produce simple VLP, formed by a single protein layer.

Saccharomyces cerevisiae, *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* have been used to produce single-layered VLP of different viruses composed of a single nucleocapsid protein or a chimeric protein assembled in one layer [7,10]. The production of multilayered VLP in yeast imposes various challenges. First, several recombinant proteins need to be simultaneously produced in each cell in conditions adequate for their self-assembly into VLP. Second, the intracellular concentration of each structural protein should be high enough to promote VLP assembly. Third, the intracellular environment should be adequate for assembly.

In this work, rotavirus-like particles (RLP) were used as a model for multiple layer VLP production in yeast. Rotavirus is the major etiological agent of gastroenteritis in children and young animals [11,12]. Each year, rotavirus causes the death of approximately 610,000 children and 39% of hospitalizations for diarrhea worldwide [13]. Moreover, rotavirus is an important cause of economic losses in animal production, including death, loss of weight and treatment of affected animals [14,15]. RLP represent an interesting alternative to traditional vaccines that are now in the market, as they are efficient immunogens, cannot revert to infectious forms, do not need to be inactivated, handling of potentially pathogenic viruses is not needed, and new recombinant vaccines for new serotypes can be rapidly and easily produced [8,9].

Rotavirus-like particles have been frequently expressed in the insect cell-baculovirus expression system [8]. This system has proven to be productive and versatile. However, insect cell culture requires high cost media and baculovirus manipulation requires highly skilled personnel. In contrast, yeast expression systems are easy to scale-up and highly productive.

RLP production requires the simultaneous expression and assembly of three recombinant proteins, 120 molecules of VP2 (inner layer), 780 molecules of VP6 (middle layer) and 780 molecules of the glycoprotein VP7 (outer layer), into triple-layered particles (tRLP) [16]. In this work, molecular strategies to simultaneously express the three recombinant proteins in *S. cerevisiae* and molecular and process strategies to increase their concentration in yeast cells were developed. To our knowledge, this is the first time that double or triple-layered VLP are produced in yeast cells.

Methods

Yeast strains and plasmids

Four *Saccharomyces cerevisiae* parental strains were used in this work: CEN.PK113-5D, W303-1a, PD 83B.1d and PJ69-4a. From these parental strains, 12 strains

were constructed (Table 1). The rotavirus VP2 gene was obtained from the bovine rotavirus strain RF. To facilitate VP2 expression, the coding sequence for its first 92 amino acids, not necessary for VLP formation [17], was eliminated, and the ribosome binding site (RBS) sequence was optimized as previously described [18]. The new RBS sequence (TTCAAACAAA) was inserted by PCR before the initial ATG codon. This truncated VP2 is identified as Δ VP2 in Figure 1 and Table 1. The VP6 gene was obtained from the NCDV rotavirus strain and the VP7 gene from the MX002 strain [19]. All rotavirus genes used in this work have a bovine origin, and their compatibility was confirmed by their amino acid sequence homology to rotavirus NCDV proteins using BLAST (accession numbers: X14057, DQ870494, DQ870496, X65940, M12394, and FJ217205). The three genes were cloned in the pSP-GM2 plasmid, a variant of the pSP-G2 plasmid, recently developed by Partow et al. [20], for multiple gene expression. The cloning strategy is presented in Figure 1. To compare the expression levels in different plasmid types, the VP6 gene was also cloned in the centromeric plasmid (pRS7) under the PMA1 promoter. Yeast transformation was performed as described previously [21]. Table 1 lists the plasmids constructed and the strains used in this study.

Culture media

Batch cultures were performed in a complete synthetic medium (CSM) without uracil. The medium contained glucose 20 g/L, yeast nitrogen base (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA) 6.7 g/L and CSM -ura 0.77 g/L (Foremedium, Hunstanton, UK). Strains PJ.T-6 and W. T-6 were cultured in CSM without tryptophan. Media composition was improved using data from two two-level factorial designs of experiments in shake flask cultures, using VP6 and biomass concentration as response variables (data not shown). Based on the obtained results, culture medium was supplemented with leucine 1.8 mM, glutamate 20 mM and succinate 50 mM. pH was adjusted to 5.0 with KOH 2 N before autoclaving. Feeding medium for fed-batch cultures was 10 X CSM without supplements.

Cultivation of recombinant yeast

All cultures were performed in triplicate in parallel 1L bioreactors (DasGip, Jülich, Germany) with a working volume of 0.7 L. pH was controlled at 5.0 with KOH 2N. The sparged air flow rate was 42 L/h (1 vvm). Carbon dioxide and oxygen concentrations in the outlet gas were measured with a DasGip GA4 gas analyzer. Cultures were inoculated to an initial OD₆₀₀ of 0.01 with a liquid preculture.

The initial volume in fed-batch cultures was 0.4 L. Feeding followed an exponential rate and started when

Table 1 Yeasts and plasmids used in this study. Parental strains and their derivatives are shown

Strain	Genotype	Plasmid	Plasmid description	Reference
W303-1a	MATa ade2-1 can1-100 ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1	-		
W.TLU-C		pRS7, pRS2, pSal4	P _{PMA1} , CEN6/ARSH4, TRP1 P _{PMA1} , 2 μ, LEU2, P _{CUP1} , 2 μ, URA3	This study
W.T-6 ^d		pRS7VP6	P _{PMA1} VP6, CEN6/ARSH4, TRP1	This study
CEN.PK.113-5D	MATa SUC2 MAL2-8c ura3-52	-		Peter Kotter ^a
CEN.U-C		pSP-GM2	P _{PGK1} , P _{TEF1} , 2 μ, URA3	This study
CEN.U-6 ^d		pWR6	P _{PGK1} , P _{TEF1} VP6, 2 μ, URA3	This study
CEN.U-267 ^e		pWR267	P _{PGK1} ΔVP2, P _{TEF1} VP6, P _{TEF1} VP7 2 μ, URA3	This study
PD 83B.1d ^b	MATa LEU ura31 TRP HIS ADE can1100 GAL SUC2	-		Stefan Hohmann ^c
PD.U-C		pSP-GM2	P _{PGK1} , P _{TEF1} , 2 μ, URA3	This study
PD.U-6 ^d		pWR6	P _{PGK1} , P _{TEF1} VP6, 2 μ, URA3	This study
PD.U-267 ^e		pWR267	P _{PGK1} ΔVP2, P _{TEF1} VP6, P _{TEF1} VP7 2 μ, URA3	This study
PJ69-4a	MATa trp1-901, leu2-3,112, ura3-52, his 3-200, gal4D gal80D	-		
PJ.U-C		pSP-GM2	P _{PGK1} , P _{TEF1} , 2 μ, URA3	This study
PJ.T-6 ^d		pRS7VP6	P _{PMA1} VP6, CEN6/ARSH4, TRP1	This study
PJ.U-6 ^d		pWR6	P _{PGK1} , P _{TEF1} VP6, 2 μ, URA3	This study
PJ.U-267 ^e		pWR267	P _{PGK1} ΔVP2, P _{TEF1} VP6, P _{TEF1} VP7 2 μ, URA3	This study

a. J. W. Goethe Universität, Germany

b. Strain with W303-1a background

c. Gothenburg University, Sweden

d. Contains the VP6 gene.

e. Contains the VP2, VP6 and VP7 genes.

the carbon dioxide transfer rate value (CTR) decreased to 2.5 mM/h, which indicated glucose depletion. The feeding profile of the culture is expressed as follows:

$$F = abx_0V_0e^{bt} \quad (1)$$

where:

$$a = \frac{Y_{s/x}}{C_s^f - C_s} \quad (2)$$

and F is the feeding flow rate; b , a feeding constant (0.19 h^{-1}), x_0 is the initial biomass concentration at the end of the batch phase; V_0 , the initial volume (0.4 L); t , time; $Y_{s/x}$, the substrate over biomass ratio (assumed to be 6.06 g glucose/g DCW for all strains); C_s^f , the substrate concentration in the feed (200 g glucose/L); and C_s , the substrate concentration at time t .

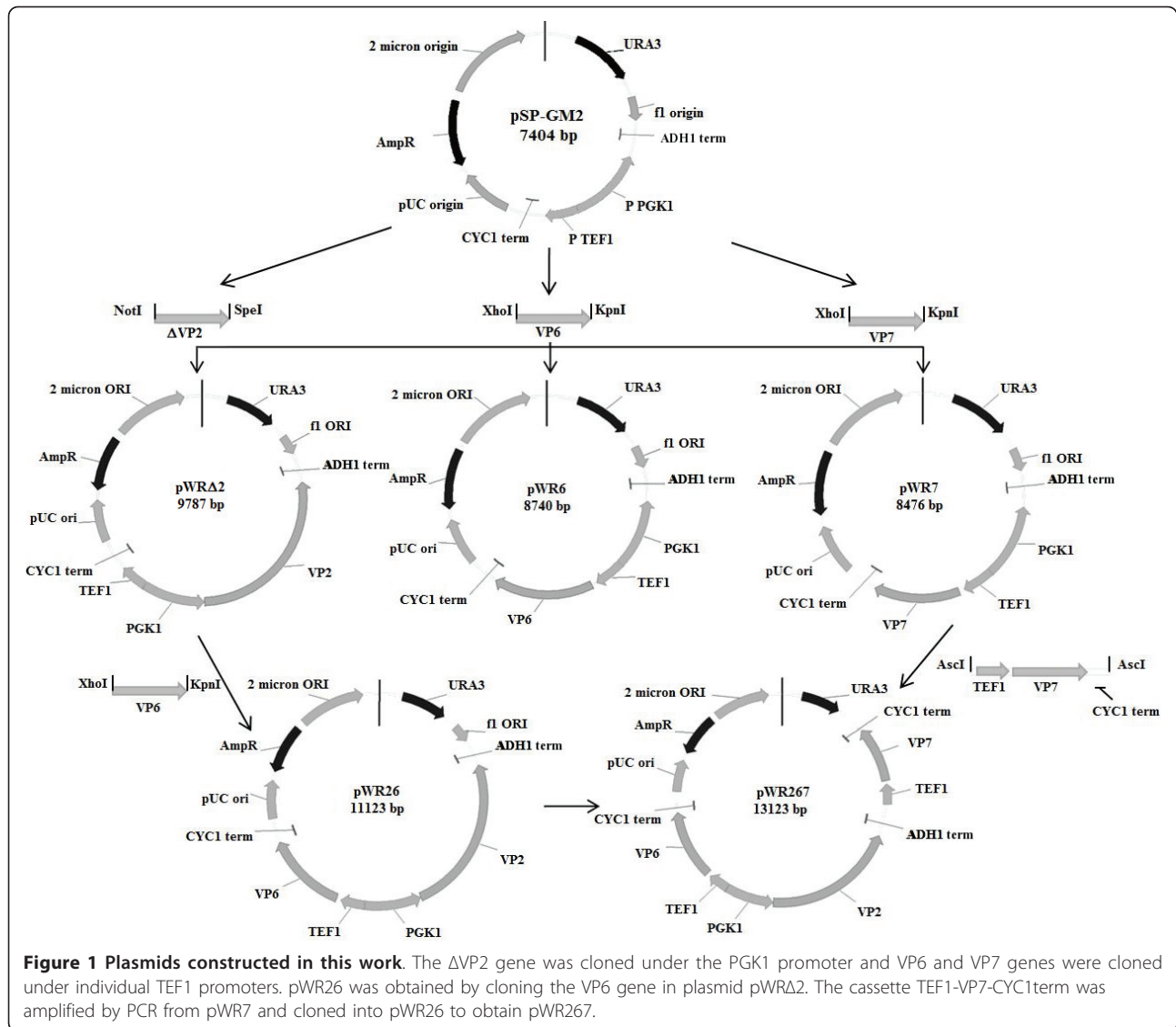
Analytical methods

Dry cell weight was measured by filtration through a 0.45 μm pore-size nitrocellulose filters (Sartorius, Göttingen, Germany) as previously described [22].

Glucose, glycerol, ethanol, pyruvate, succinate and acetate concentrations were measured in culture supernatants by HPLC (UltiMate[®] 3000 Standard LC system, Dionex, California, USA) using a HPX-87H Aminex

column (Biorad, Richmond, CA, USA) at 50°C with 5 mM H₂SO₄ as mobile phase at 0.6 mL/min.

Recombinant proteins were extracted from the cell pellet using YeastBuster protein extraction buffer (EMD Biosciences, Inc, Darmstadt, Germany) following the manufacturer's instructions. VP6 was quantified by ELISA (ProSpecT, Oxoid, Cambridge, UK). VP2, VP6 and VP7 were detected by immunoblotting with monoclonal antibodies at different stages of purification. Briefly, 200 μL of each sample were filtered through a nitrocellulose membrane using a Bio-dot[®] apparatus (Biorad, Richmond, CA, USA). Membranes were blocked with 5% non-fat dried milk in phosphate buffered solution (PBS), incubated for 1 h with monoclonal antibodies in PBS with 0.1% non-fat milk (3A8 for VP2, 255 for VP6 and IC3 for VP7, kindly provided by Drs. Arias and López, IBt- UNAM, Mexico). All monoclonal antibodies used bind conformational epitopes. Therefore, non-denaturing conditions are required for detecting rotavirus proteins with them. Membranes were washed three times with PBS with 0.1% non-fat milk, incubated for 1 h with a goat anti-mouse antibody conjugated with peroxidase (Jackson, Immunoresearch laboratories, West Grove, PA, USA), and washed three times. Peroxidase activity was detected by reaction with



carbazole. Inactivated rotavirus strain SA-11 was used as positive control.

RLP were recovered as follows: Yeast intracellular extracts were ultracentrifuged over a 35% sucrose cushion at $112,700 \times g$ for 2 h at 4°C in a SW-28 rotor and an Optima L-90K ultracentrifuge (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). The pellet obtained was resuspended in TNC buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.15 M NaCl, 10 mM CaCl₂). Cesium chloride was added to resuspended pellets to a concentration of 0.42 g/mL. Sample was centrifuged at $148,930 \times g$ for 18 h at 4°C in a SW 55 Ti rotor (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). Opalescent bands were isolated and observed by transmission electron microscopy (TEM). Samples were visualized by negative staining: Twenty five microliters of sample were fixed for 1 min in a 200 mesh grid coated with formvar-carbon (Structure probe Inc., West

Chester, PA, USA). The grid was washed with ultrapure water and stained with 3% uranyl acetate (Structure probe Inc, West Chester, PA, USA), rinsed and left to dry. Samples were observed in a transmission electron microscope Jeol 1200EXII (Jeol, Peabody, MA, USA) operated at 80 KV.

Cushion sucrose pellets and CsCl gradient bands were also analyzed in sodium dodecyl sulfate (SDS)-12% polyacrylamide gels stained with Coomassie Brilliant Blue or blotted onto a PVDF membrane (Immobilon-P, Millipore, Billerica, MA, USA) in a wet chamber. Membranes were blocked with PBS-5% non-fat dry milk and incubated with a rabbit anti-rotavirus serum for 2 h at room temperature. Membranes were washed twice with PBS-0.1% non-fat dry milk and incubated with a peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (Jackson, Immunoresearch laboratories, West Grove, PA, USA)

for 1 h at room temperature. Membranes were washed three times with PBS-0.1% non-fat dry milk and peroxidase activity was detected by reaction with the chemiluminescence substrate Western Lightning Plus ECL (Perkin Elmer Inc, Waltman, MA USA). Gels and membranes were scanned and analyzed using a ChemiDoc system and the Image Lab 2.0 software (Biorad, Richmond, CA, USA).

Results

Molecular strategies for the simultaneous expression of three rotavirus genes

Plasmid and strain selection

tRLP production requires the simultaneous presence in each cell of three rotavirus proteins, VP2, VP6 and VP7, which can be pursued by transforming cells with three plasmids, each containing one gene and complementing one auxotrophy, or by constructing a single plasmid containing the three genes. In order to assess the best of these two approaches, growth kinetics of two strains were determined, one containing a single centromeric plasmid expressing VP6 (W.T-6) and one containing three empty plasmids (W.TLU-C): one centromeric single copy plasmid (YCp) and two episomal high copy plasmids (YEp) (Table 1). Table 2 shows the maximum specific growth rate and biomass yield on glucose of both strains in batch culture. Three plasmids in the same cell decreased the maximum specific growth rate by 36%, compared with the strain with a single plasmid, but it did not significantly influence biomass yield on glucose. The W.TLU-C strain reached its maximum biomass concentration 12 h later than the W.T-6 strain. These results show that using three plasmids increased the metabolic burden in auxotrophic yeast, probably due to the need to complement three auxotrophies or to the burden of producing multiple copies of each of the three plasmids. A higher metabolic burden deviates carbon and nitrogen resources from heterologous protein synthesis, and can be expected to result in lower recombinant protein yields. Thus, the use of three individual plasmids was not adequate for the coexpression of three proteins and was not further pursued. To reduce the number of plasmids and auxotrophic markers used, a

second approach was devised, where one or three genes were introduced in a single multi copy plasmid. The constitutive promoters PGK1 and TEF1 were used (Figure 1 and Table 1). Genes cloned under these promoters are expected to be constitutively expressed during the whole culture, and expression levels should be independent of the carbon or nitrogen sources used by the cell [20].

To identify the best recombinant protein producers, four different yeast strains and two different plasmid variants (YCp and YEp) containing only the VP6 gene were evaluated in batch cultures using CSM without supplementation. Biomass and VP6 kinetics are shown in Figure 2, while kinetic and stoichiometric parameters are listed in Table 3. The strain with the highest growth rate, PD.U-6 started growing before all strains and reached the highest cell concentration. In contrast, growth of the CEN.U-6 strain was delayed and the lowest cell concentration was obtained. The PJ.T-6 strain produced the highest VP6 concentration, which was 2.7 times higher than the VP6 concentration produced by

Table 2 Kinetic and stoichiometric parameters of strains with one (W.T-6) or three (W.TLU-C) plasmids in the same cell

Parameter	Strain	
	W.T-6	W.TLU-C
μ_{max} (h ⁻¹)	0.250 ± 0.010	0.159 ± 0.011
T _D (h)	2.77 ± 0.12	4.33 ± 0.30
Y _{x/s} (g DCW/g glucose)	0.133 ± 0.001	0.147 ± 0.002
Culture time (h)	24	36

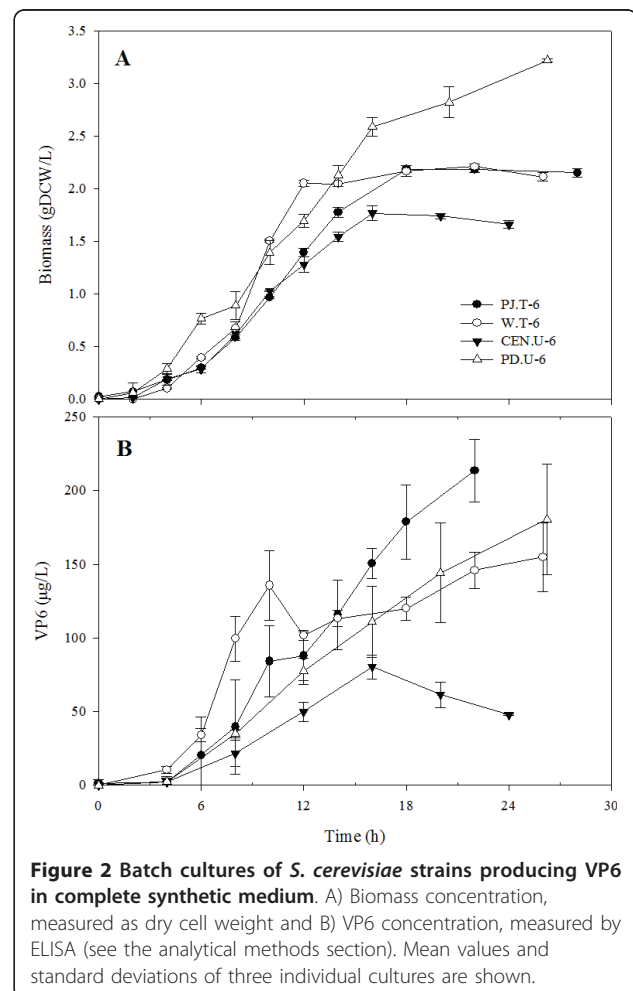


Table 3 Kinetic and stoichiometric parameters of batch cultures for VP6 producers

Parameter	Strain			
	PJ.T-6	W.T-6	CEN.U-6	PD.U-6
μ_{\max} (h^{-1})	0.259 ± 0.005	0.276 ± 0.019	0.251 ± 0.035	0.299 ± 0.019
VP6 ($\mu\text{g/L}$)	214 ± 21	154 ± 23	80 ± 1	181 ± 37
$Y_{x/s}$ (g DCW/g glucose)	0.107 ± 0.002	0.105 ± 0.002	0.088 ± 0.003	0.160 ± 0.001
$Y_{p/x}$ ($\mu\text{g VP6/g DCW}$)	99.42 ± 7.95	73.35 ± 9.61	45.47 ± 2.76	56.13 ± 11.46
$Y_{p/s}$ ($\mu\text{g VP6/g glucose}$)	10.68 ± 1.05	7.74 ± 1.16	4.02 ± 0.40	9.03 ± 1.88
Specific productivity ($\mu\text{g VP6/gDCW} \cdot \text{h}$)	4.52 ± 0.36	2.82 ± 0.37	2.84 ± 0.17	2.14 ± 0.44
Volumetric productivity ($\mu\text{g VP6/L} \cdot \text{h}$)	9.70 ± 0.95	5.96 ± 0.89	5.02 ± 0.50	6.88 ± 1.43

the CEN.U-6 strain. The specific VP6 yield and the VP6 yield on glucose of strain PJ.T-6 were the highest among the strains characterized. In general, VP6 production was growth-associated, but VP6 concentration decreased after glucose consumption in CEN.U-6 cultures (data not shown), possibly as a result of a high protease activity at the end of the culture. A similar behavior has been reported during VLP production in batch cultures after glucose depletion and before ethanol consumption [23]. The lowest specific productivity was observed in strain PD.U-6, while the lowest volumetric productivity was obtained with strain CEN.U-6. Due to the decrease in VP6 concentration observed in cultures of strain CEN.U-6 after glucose depletion and its lower volumetric productivity, strain CEN.U-6 was discarded for the simultaneous production of the three rotavirus proteins and fed batch culture improvements. No effect of the plasmid variant used was observed, even when YEp plasmids have up to 100 copies per cell [24]. Strains PJ.T-6 and PD.U-6 had the highest volumetric productivities in batch cultures. Therefore, their parental strains, PJ69-4a and PD 83B.1d, were used to construct new strains with the multicopy plasmids pWR6 and pWR267 capable of producing VP6 (strains PJ.U-6) and VP2, VP6 and VP7 in the same cell (PD.U-267 and PJ.U-267). These new strains were compared for their heterologous protein production capability in fed-batch culture conditions.

Process strategies for the simultaneous expression of three rotavirus genes

Fed batch cultures

Fed batch cultures of PD.U-6, PD.U-267, PJ.U-6 and PJ.U-267 strains were performed. Biomass concentration and VP6 production were followed during cultures (Figure 3). Yields and productivities are illustrated in Figure 4. As observed in batch cultures, PJ strains grew slower than PD strains before and after the fed-batch stage. Accordingly, maximum biomass concentrations of the PJ.U strains were 3.5 times lower than those of PD.U strains. VP6 concentration before nutrient feeding was less than 1 mg/mL in all strains. VP6 accumulated faster

during the feeding stage. Maximum VP6 concentrations obtained ranged from 1 to 7 mg/L in strains PJ.U-6 and PD.U-267, respectively. Interestingly, when VP6 was produced alone, its concentration was three- to two-fold lower than when it was co-expressed with VP2 and VP7 (Figure 4A), regardless of the strain used. $Y_{p/x}$ was similar in strains PJ.U-6, PJ.U-267 and PD.U-6, but increased more than three-fold in strain PD.U-267 (Figure 4B),

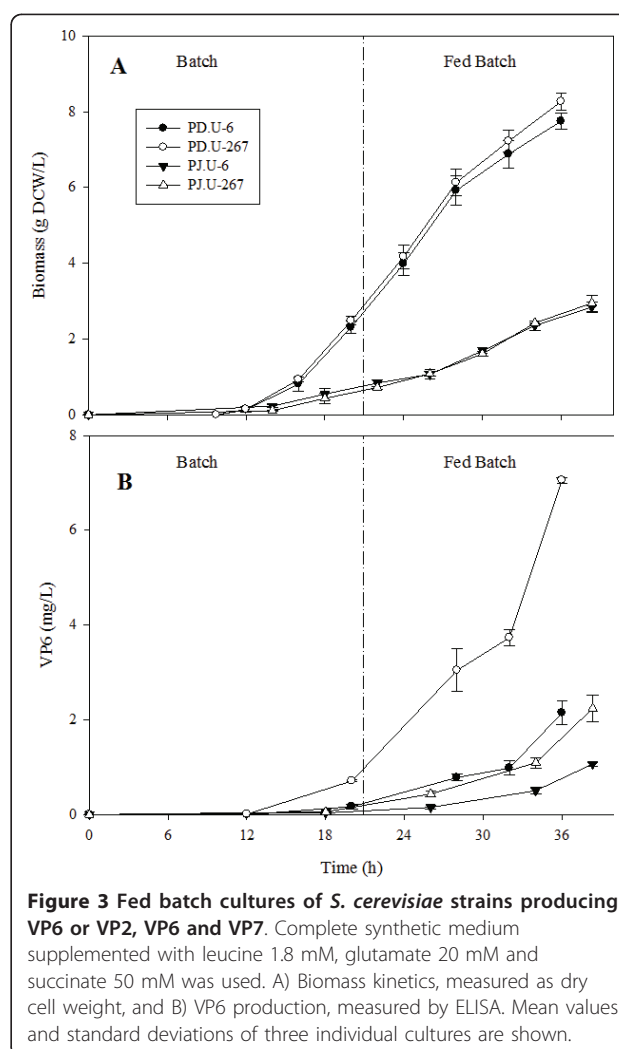
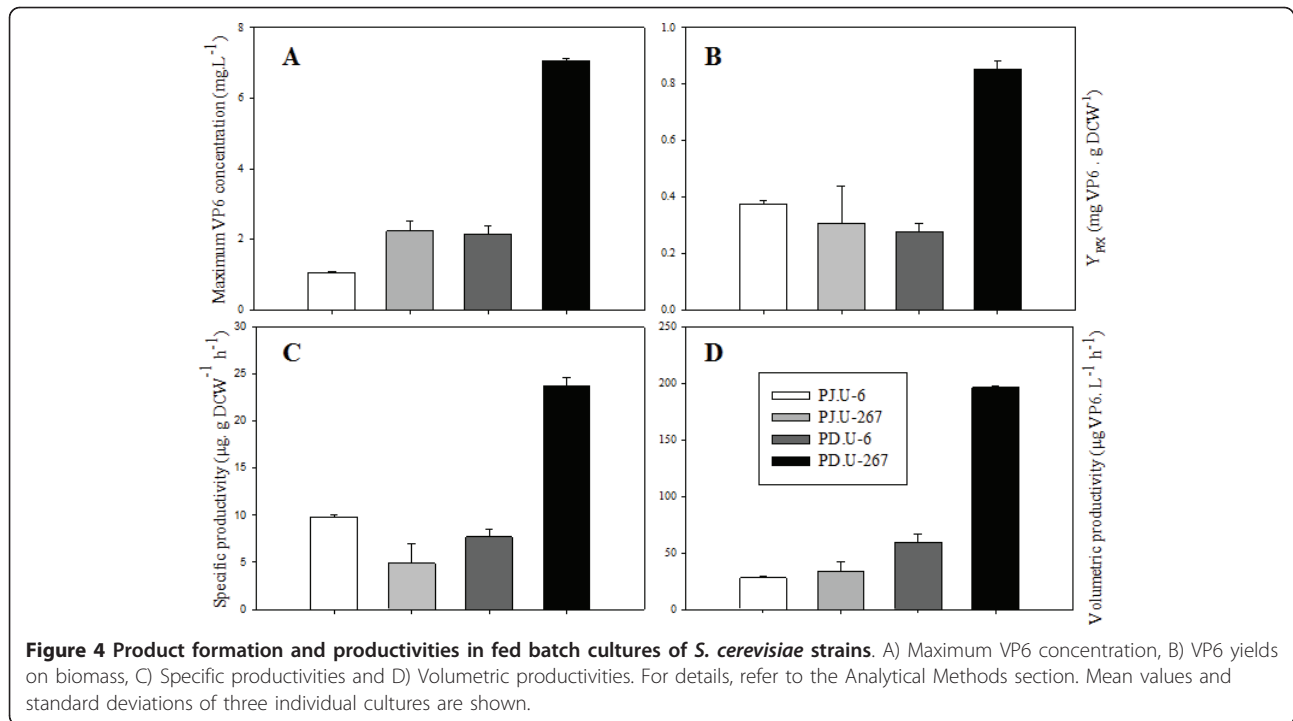


Figure 3 Fed batch cultures of *S. cerevisiae* strains producing VP6 or VP2, VP6 and VP7. Complete synthetic medium supplemented with leucine 1.8 mM, glutamate 20 mM and succinate 50 mM was used. A) Biomass kinetics, measured as dry cell weight, and B) VP6 production, measured by ELISA. Mean values and standard deviations of three individual cultures are shown.



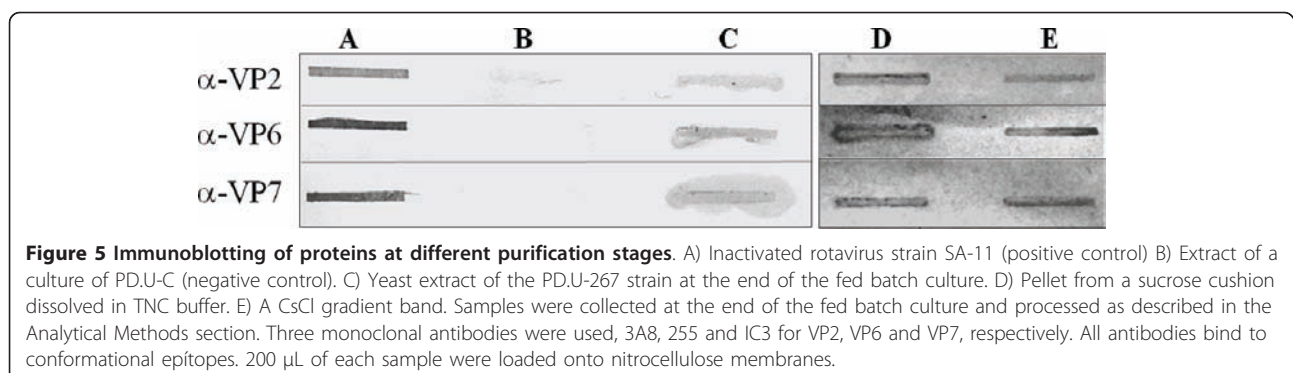
reflecting a more efficient nutrient utilization for heterologous protein production in this strain. Strain PD.U-267 had the highest specific and volumetric productivities (Figures 4C and 4D).

Yeast extracts of PD.U-267 were submitted to a sucrose cushion and isopycnic ultracentrifugation to recover tRLP. The presence of VP2, VP6 and VP7 in different purification stages was detected by immunoblotting using monoclonal antibodies (Figure 5). CsCl bands were analyzed by SDS-PAGE and Western Blot (Figure 6A and 6B), showing the presence of the three rotavirus proteins. Densitometry of SDS-PAGE gels revealed a relative mass ratio of the three recombinant rotavirus proteins VP2:VP6:VP7 of 1:12:4 in samples from gradients band. RLP were observed by TEM in the bands recovered by ultracentrifugation (Figure 6C and 6D). tRLP had a morphology similar to that previously

reported [25]. Measurements of the RLP obtained were performed using the ImageJ software (Wayne Rasband, NIH, USA), and correspond to the expected size (71 ± 5 nm) for RLP. The presence of the three recombinant proteins in the preparations obtained after purification by density gradients and TEM images confirm the successful production of triple-layered RLP in yeast. Low VP7 concentration in the purified bands could be related to a lower quantity of protein produced or inadequate aggregation conditions related to glycosylation patterns and transport phenomena from the ER to assemble into tRLP.

Discussion

In this work, strategies for the production of triple-layered VLP in yeast were implemented. Our first attempts to express rotavirus VP6 in batch cultures



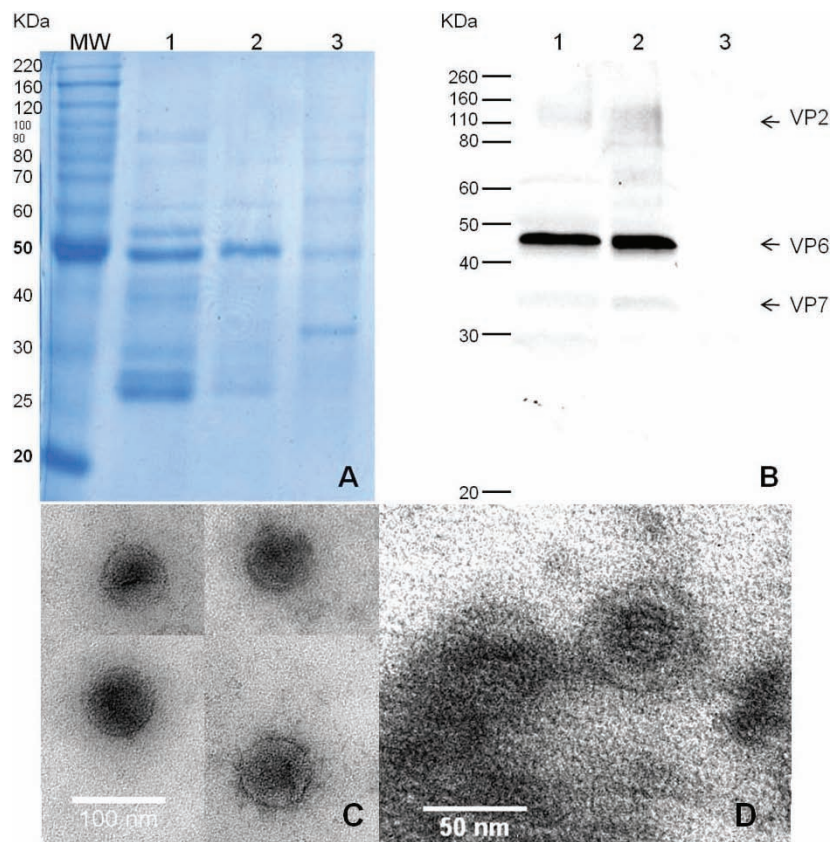


Figure 6 Analysis of rotavirus-like particles obtained from cesium chloride gradients. A) and B) SDS-PAGE and Western blot analysis of two opalescent bands isolated from yeast extracts of two different cultures (lanes 1 and 2). Yeast extract of the PDU-C strain as negative control (lane 3). Each lane was loaded with 5 μ g of total protein. C) and D) Transmission electron micrographs of rotavirus-like particles recovered by cesium chloride gradients. Samples were stained with 3% uranyl acetate. Magnification 150,000 \times and 250,000 \times , respectively.

(data not shown) resulted in concentrations four orders of magnitude lower than those routinely obtained in our laboratory in the insect cell-baculovirus system, ca. 200 mg/L (unpublished results). High recombinant protein concentration is especially important for the production of VLP, as higher concentrations are expected to result in higher assembly efficiency both *in vivo* and *in vitro* methods [1]. Therefore, molecular and process strategies for increasing the concentration of recombinant rotavirus proteins in yeast were designed in this work to allow their assembly into tRLP. First, the use of three individual plasmids was compared with the use of a single plasmid. The use of three plasmids resulted in an important metabolic burden, as evidenced by a decrease in growth rate in comparison with the strain with a single plasmid. Using a single plasmid for the expression of the three rotavirus genes has several advantages: (a) the copy number is the same for each rotavirus gene, (b) the nucleic acid demand is reduced, and (c) only one auxotrophy needs to be complemented. Several authors have previously reported that the metabolic burden of recombinant protein production in *S. cerevisiae* increase

due to plasmid copy number amplification [26-28]. Therefore, the use of a single plasmid expressing the three rotavirus genes was pursued (see Figure 1). Interestingly, no difference in growth rate was observed when the same strain with a single plasmid expressed one or three recombinant proteins (Figure 3A), suggesting that the burden imposed by three plasmids was not due to the simultaneous expression of three recombinant genes, but to the load of plasmid amplification or to the need of complementing three auxotrophies.

To select the yeast strain and plasmid to be used for the production of tRLP, four *Saccharomyces cerevisiae* laboratory strains with different auxotrophic markers and two types of plasmids, YCp (low copy number) and YEp (high copy number) containing only the rotavirus VP6 gene, were evaluated. The CEN.PK. strains have been used for the industrial production of metabolites and some extracellular proteins in laboratory and commercial applications [29]. CEN.PK.113-5D strain has only one auxotrophy for Ura. The W303-1a is a widely used laboratory haploid strain and has 5 auxotrophies (see Table 1). The PD strain was obtained from the

W303-1a strain through the repair of four of its auxotrophies, leaving only an auxotrophy for Ura. e PJ69-4a was developed for the two-hybrid system and has four auxotrophies. VP6 production was growth-associated in all strain and plasmid combinations. The best VP6 producers were the PJ.T-6 and the PD.U-6 strains (Table 3). While the PJ.T-6 strain has 5 auxotrophies, the PD.U-6 has only one. All auxotrophies for the PJ.T-6 strain were supplemented, with the exception of Ura. A decrease in VP6 concentration after the onset of the stationary growth phase was observed only in cultures of the CEN.U-6 strain, most likely a result of protease activity. Although in this work no efforts were pursued to identify the proteases involved, other studies have reported a high aspartyl and serine protease activities (PrA and PrB, mainly) in *Saccharomyces* strains expressing a recombinant hepatitis B surface antigen (rHBsAg) [23]. PrA and PrB are located in the vacuole and are released to the extracellular space when cells rupture. Their concentration increases in response to nutritional stress, and results in important protein degradation [30,31]. No effect of the type of plasmid used for the individual expression of VP6 was observed. This behavior could be related to a higher stability of centromeric plasmids in comparison with plasmids based on 2 m sequences, even when the later have higher copy numbers [24].

Selection of the best strain increased recombinant VP6 concentration one order of magnitude. However, VP6 concentration was still three orders of magnitude lower than that obtained in insect cell cultures. Therefore, efforts were aimed at increasing the recombinant protein concentration by using fed-batch cultures, and evaluating two strains that were the best producers in batch cultures. Nutrient feeding increased VP6 concentration 11 times, when VP6 was expressed alone, and 28 times when it was coexpressed with VP2 and VP7. VP6 concentration was three-fold higher when it was coexpressed with VP2 and VP7. This behavior could be associated with a synergistic stabilization of the three structural proteins, protecting them from proteases by their complex structure at the end of the fed batch culture. PJ.U strains grew slower in fed batch cultures and produced less recombinant protein than the PD.U strains. This behavior could be associated to the number of auxotrophies of the PJ.U strain and/or a non-optimized feeding strategy. The maximum VP6 concentration obtained in fed-batch cultures was 144 times higher than the first batch cultures without strain or plasmid selection. The PD.U strains were also the most productive, with a productivity of 196 $\mu\text{g/L h}$.

The modifications of (a) supplementing limiting metabolites and (b) using a single vector with all three genes increased productivity in batch and fed batch cultures in

complete synthetic medium without sacrificing the strong selection pressure that would be lost in complex media. The higher cost associated with defined and supplemented media may be justified on the basis of increased reproducibility, productivity and regulatory requirements for industrial purposes [32].

VLP formation in *Saccharomyces cerevisiae* was evident in transmission electron microscopy images. However, the VP7/VP6 ratio measured by densitometry in SDS-PAGE gels was 59% lower than that present in the triple-layered rotavirus particle (VP7 mass/VP6 mass = 0.83, calculated from the molecular weight of VP7 and VP6). The observed rotavirus protein ratio in CsCl gradients indicates that only 41% of the obtained rotavirus-like particles were triple layered, as a result of an inefficient assembly or expression of VP7. Thus, a challenge that must be overcome for rotavirus VLP expression in yeast is increasing the heterologous protein concentration to promote a more efficient self-assembly into VLP. In the case of recombinant VLP production in *S. cerevisiae*, limitations in accumulation of VLP can result from (a) limitation of raw materials for the synthesis of the different components of VLP, (b) protein degradation processes, (c) inhibition of proper particle formation, (d) physical constraints on volume in the cytosol, among others. These factors may work in synergistic ways to limit productivity, i.e. limitations in particle formation may divert recombinant protein to degradation processes. Volumetric productivities of rotavirus proteins in this study are still one order of magnitude lower than the values reached in insect cells [8]. As the culture media, the production process and the equipment required for recombinant protein production in yeast systems are simpler and less expensive than those used in the insect cell system, we believe that yeast are an attractive option for tIRLP production.

In the present study, the simultaneous production of three proteins aimed to the production of triple-layered VLP is shown for the first time in yeast. Although, tIRLP concentration was very low in comparison with other expression platforms, this study constitutes the basis for economic and easy large-scale production of these complex proteins in an efficient system such as yeast. These developments should be useful for the antigen production in a recombinant veterinary vaccine formulation, but can be extrapolated to human use, when the process conditions and the economic costs associated to downstream processes become competitive.

Abbreviations

b: Feeding constant (0.19 h^{-1}); C_f^i : Substrate concentration in the feed (g glucose/L); C_t : Substrate concentration at time t (g glucose/L); CSM: Complete synthetic medium; CTR: Carbon dioxide transfer rate value (mM/h); F: Feeding flow rate (mL/h); IC-BVS: Insect cell/baculovirus system; OD_{600} : Optical density measured at 600 nm; PBS: Phosphate buffered solution; PGK1: Phosphoglycerate kinase 1 promoter; PMA1: Plasma membrane

ATPase 1 promoter; RBS: Ribosome binding site; rHBsAg: Recombinant hepatitis B surface antigen; RLP: Rotavirus-like particles; TEF1: Transcriptional elongation factor 1 promoter; TEM: Transmission electron microscopy; tIRLP: Triple layered rotavirus-like particles; VLP: Virus-like particles; Vo: Initial volume in batch stage (L); vvm: Gas volume flow per unit of liquid volume per minute (min^{-1}); x_0 : Initial biomass concentration at the end of the batch phase (g/L); YCp: Yeast centromeric plasmid; YEp: Yeast episomal plasmid; $Y_{s/r}$: Substrate over biomass ratio (g glucose/g DCW)

Acknowledgements

Financial support by DGAPA IN-224409, CONACyT-Salud 2007-c01-69911, SEP-CONACyT 2008-c01-101847, NIH F32 Kirschstein NRSA fellowship, The Knut and Alice Wallenberg Foundation, EU Framework VII project SYSINBIO (Grant no. 212766), the European Research Council project INSYSBIO (Grant no. 247013), and the Chalmers Foundation. W. Rodríguez-Limas was supported during his graduate studies by CONACyT scholarship No. 210328. Helpful discussions with Prof. Jorge Luis Folch. Technical assistance by V. Hernández. We thank Siavash Partow for providing the pSP-GM2 plasmid and Dr. Alba Lecona (INSP) for support on electron microscopy.

Author details

¹Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Apdo. Postal. 510-3. Cuernavaca, Morelos, CP. 62250, México. ²Systems Biology, Department of Chemical and Biological Engineering, Chalmers University of Technology, Kemivägen 10, Gothenburg, SE-41296, Sweden.

Authors' contributions

WARL performed the study design and the experimental work, participated in data analysis and manuscript writing. KEJT participated in the design of the expression vectors and the fermentation strategy and in the fermentation experimental work. JN participated in the design of the expression vectors and the fermentation strategy. OTR participated in study design, data analysis and critically revised the manuscript. LAP conceived and coordinated the study, participated in study design, data analysis and manuscript writing. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 15 December 2010 Accepted: 14 May 2011

Published: 14 May 2011

References

- Pattenden LK, Middelberg AP, Niebert M, Lipin DI: **Towards the preparative and large-scale precision manufacture of virus-like particles.** *Trends Biotechnol* 2005, **23**(10):523-529.
- Kwak M, Minten IJ, Anaya DM, Musser AJ, Brasch M, Nolte RJ, Mullen K, Cornelissen JJ, Herrmann A: **Virus-like particles templated by DNA micelles: a general method for loading virus nanocarriers.** *J Am Chem Soc* 2010, **132**(23):7834-7835.
- Plascencia-Villa G, Saniger JM, Ascencio JA, Palomares LA, Ramirez OT: **Use of recombinant rotavirus VP6 nanotubes as a multifunctional template for the synthesis of nanobiomaterials functionalized with metals.** *Biotechnol Bioeng* 2009, **104**(5):871-881.
- Ludwig C, Wagner R: **Virus-like particles-universal molecular toolboxes.** *Curr Opin Biotechnol* 2007, **18**(6):537-545.
- Grgacic EV, Anderson DA: **Virus-like particles: passport to immune recognition.** *Methods* 2006, **40**(1):60-65.
- Chackerian B: **Virus-like particles: flexible platforms for vaccine development.** *Expert Rev Vaccines* 2007, **6**(3):381-390.
- Noad R, Roy P: **Virus-like particles as immunogens.** *Trends Microbiol* 2003, **11**(9):438-444.
- Palomares LA, Ramirez OT: **Challenges for the production of virus-like particles in insect cells: The case of rotavirus-like particles.** *Biochemical Engineering Journal* 2009, **45**(3):158-167.
- Federico M: **Virus-like particles show promise as candidates for new vaccine strategies.** *Future virology* 2010, **5**(4):371-374.
- Stockmann C, Scheidel M, Dittrich B, Merckelbach A, Hehmann G, Melmer G, Klee D, Buchs J, Kang HA, Gellissen G: **Process development in *Hansenula polymorpha* and *Arxula adenivorans*, a re-assessment.** *Microb Cell Fact* 2009, **8**:22.
- Dhama K, Chauhan RS, Mahendran M, Malik SV: **Rotavirus diarrhea in bovines and other domestic animals.** *Vet Res Commun* 2009, **33**(1):1-23.
- Parashar UD, Hummelman EG, Bresse JS, Miller MA, Glass RI: **Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children.** *Emerg Infect Dis* 2003, **9**(5):565-572.
- Parashar UD, Gibson CJ, Bresse JS, Glass RI: **Rotavirus and severe childhood diarrhea.** *Emerg Infect Dis* 2006, **12**(2):304-306.
- Holland RE: **Some infectious causes of diarrhea in young farm animals.** *Clin Microbiol Rev* 1990, **3**(4):345-375.
- Saif LJ, Fernandez FM: **Group A rotavirus veterinary vaccines.** *J Infect Dis* 1996, **174**(Suppl 1):S98-106.
- Pesavento JB, Crawford SE, Estes MK, Prasad BV: **Rotavirus proteins: structure and assembly.** *Curr Top Microbiol Immunol* 2006, **309**:189-219.
- Lawton JA, Zeng CQ, Mukherjee SK, Cohen J, Estes MK, Prasad BV: **Three-dimensional structural analysis of recombinant rotavirus-like particles with intact and amino-terminal-deleted VP2: implications for the architecture of the VP2 capsid layer.** *J Virol* 1997, **71**(10):7353-7360.
- Miyasaka H: **The positive relationship between codon usage bias and translation initiation AUG context in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Yeast* 1999, **15**(8):633-637.
- Rodríguez-Limas WA, Flores-Samaniego B, de la Mora G, Ramirez OT, Palomares LA: **Genotypification of bovine group A rotavirus in Mexico.** *Vaccine* 2009, **27**(46):6411-6414.
- Partow S, Siewers V, Bjorn S, Nielsen J, Maury J: **Characterization of different promoters for designing a new expression vector in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Yeast* 2010, **27**:955-964.
- Gietz RD, Schiestl RH: **High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method.** *Nat Protoc* 2007, **2**(1):31-34.
- Dynesen J, Smits HP, Olsson L, Nielsen J: **Carbon catabolite repression of invertase during batch cultivations of *Saccharomyces cerevisiae*: the role of glucose, fructose, and mannose.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 1998, **50**(5):579-582.
- Gimenez JA, Monkovic DD, Dekleva ML: **Identification and monitoring of protease activity in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*.** *Biotechnol Bioeng* 2000, **67**(2):245-251.
- Porro D, Sauer M, Branduardi P, Mattanovich D: **Recombinant protein production in yeasts.** *Mol Biotechnol* 2005, **31**(3):245-259.
- Castro-Acosta RM, Revilla AL, Ramirez OT, Palomares LA: **Separation and quantification of double and triple-layered rotavirus-like particles by CZE.** *Electrophoresis* 2010, **31**(8):1376-1381.
- Gorgens JF, van Zyl WH, Knoetze JH, Hahn-Hagerdal B: **The metabolic burden of the PGK1 and ADH2 promoter systems for heterologous xylanase production by *Saccharomyces cerevisiae* in defined medium.** *Biotechnol Bioeng* 2001, **73**(3):238-245.
- Janes M, Meyhack B, Zimmermann W, Hinnen A: **The influence of GAP promoter variants on hirudin production, average plasmid copy number and cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Curr Genet* 1990, **18**(2):97-103.
- Nacken V, Achstetter T, Degryse E: **Probing the limits of expression levels by varying promoter strength and plasmid copy number in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Gene* 1996, **175**(1-2):253-260.
- Entian KD, Kotter P: **Yeast genetic strains and plasmid collections.** In *Yeast gene analysis. Volume 36*. Edited by: Ian S, Stark MJ. The Netherlands: Academic Press; 2007:629-666.
- Jones EW: **Three proteolytic systems in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** *J Biol Chem* 1991, **266**(13):7963-7966.
- Parr CL, Keates RA, Bryksa BC, Ogawa M, Yada RY: **The structure and function of *Saccharomyces cerevisiae* proteinase A.** *Yeast* 2007, **24**(6):467-480.
- Mendoza-Vega O, Sabatie J, Brown SW: **Industrial production of heterologous proteins by fed-batch cultures of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** *FEMS Microbiol Rev* 1994, **15**(4):369-410.

doi:10.1186/1475-2859-10-33

Cite this article as: Rodríguez-Limas *et al.*: Molecular and process design for rotavirus-like particle production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories* 2011 **10**:33.

ANEXO E. Artículo *Vaccine* 2009

Rodriguez-Limas WA, Flores-Samaniego B, de la Mora G, Ramírez OT, Palomares LA: **Genotypification of bovine group A rotavirus in Mexico**. *Vaccine* 2009, **27**(46):6411-6414.



Genotypification of bovine group A rotavirus in México

William A. Rodríguez-Limas^{a,1}, Beatriz Flores-Samaniego^b, Germán de la Mora^b,
Octavio T. Ramírez^{a,1}, Laura A. Palomares^{a,*}

^a Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal, 510-3, Cuernavaca, Morelos, CP 62250, Mexico

^b Tecnología Biológica de México, Zapopan, Jalisco, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Available online 24 June 2009

Keywords:

Bovine diarrhea
Rotavirus
Genotyping

ABSTRACT

Bovine scours, frequently provoked by rotavirus infection, causes significant economic losses. Nevertheless, no information exists about the bovine rotavirus genotypes present in Mexico. This information is necessary for designing efficient vaccines. In this work, 128 samples from diarrheic calves were collected between 2005 and 2006 in 26 dairy and/or beef cattle herds located in 10 regions of Mexico, and analyzed for the presence of group A rotavirus. G and P genotypes were determined by PCR in rotavirus-positive samples (12/128). Three different genotype combinations were found, G10, P[11]; G6, P[5]; and G10, P[5]; in 67, 25 and 8% of the positive samples, respectively. Some rotavirus-positive animals had been vaccinated with an inactivated rotavirus strain of a different genotype.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Rotavirus (family *Reoviridae*) is the main cause of neonatal diarrhea in bovines and porcines [1,2]. It is a non-enveloped icosahedral virus with a double-stranded segmented RNA (dsRNA) genome. Rotaviruses are classified serologically in seven major groups (A–G), according to the VP6 protein. Most of the strains isolated from animals belong to group A [3]. Additionally, the external viral capsid proteins VP7 and VP4 and their genes have been used to classify rotavirus into G (glycoprotein) and P (protease sensitive) serotypes and genotypes. Genotyping has been preferred to serotyping due to its higher sensitivity and the use of universal reagents. Genotyping PCR assays are particularly useful for viruses that easily lose their outer proteins [4] or when monoclonal antibodies are not available, as is the case of P rotavirus serotyping. Over 15 G and 27 P genotypes have been identified to date [3,5–8].

Genotyping of group A rotavirus is essential for epidemiological studies and for designing efficient vaccines [9]. It has been shown that vaccination with a particular rotavirus strain provides only limited protection against other genotypes [10], underlying the importance of knowing the genotype prevalence in a region. G and P genotype combinations most commonly found in cattle are G10, P[11]; G6, P[5] and G6, P[1] [4,10–14]. In Mexico, vaccines containing inactivated NCDV (G6, P[1]) rotavirus have been administered to pregnant cows to provide passive immunity to newborn calves.

Calves become protected when they receive high titres of specific neutralizing antibodies against rotavirus through the colostrum or milk [15]. However, no reports exist on the rotavirus genotypes that are present in Mexico. The goal of this study is to determine the group A rotavirus G and P genotypes in faecal samples from calves in Mexico.

2. Materials and methods

2.1. Faecal samples and group A rotavirus detection

One hundred and twenty-eight faecal samples from calves between 2 and 45 days of birth with diarrheic symptoms were collected between November 2005 and June 2006 from 26 dairy and/or beef cattle herds located in 10 states from different regions of Mexico (Baja California, Chihuahua, Durango, Jalisco, Aguascalientes, Veracruz, Hidalgo, Querétaro, Tabasco and Chiapas). Samples were stored at -70°C until analysis. Rotavirus presence was assessed with an immunocard that detects group A rotavirus VP6 (Immunocard Stat Rotavirus, Meridian Bioscience Inc., Cincinnati, USA). Positive samples were treated as described below.

2.2. RNA extraction

Rotavirus dsRNA was extracted from 20% faecal suspensions using the QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Westburg, Holland), as described by the manufacturer. Briefly, samples were centrifuged for 5 min at 8000 rpm. 140 μL of supernatant was added to 560 μL of lysis buffer to inactivate RNases and ensure isolation of intact viral RNA. 560 μL of 100% ethanol was added. This mixture was

* Corresponding author. Tel.: +52 777 329 1863/1617; fax: +52 777 313 8811.

E-mail address: laura@ibt.unam.mx (L.A. Palomares).

¹ Tel.: +52 777 329 1863/1617; fax: +52 777 313 8811.

Table 1
Primers used to amplify VP7 gene and for G-typing bovine group A rotavirus [16].

Primer name	Sequence	Location
VP7 amplification		
Bov9Com5	5'-TGTATGGTATTGAATATACCAC-3'	50–71
Bov9Com3	5'-TCACATCATACAACCTAATCT-3'	1039–1060
G-typing		
G6	5'-CTAGTTCCTGTGTAGAATC-3'	499–481
G8	5'-CGGTTCCGATTAGACAC-3'	273–256
G10	5'-TTCAGCCGTTGCGACTTC-3'	714–697

applied to a QIAamp column and contaminants were washed away in two steps. RNA was then eluted in 60 μ L of RNase-free water. The extracted dsRNA was stored at -70°C .

2.3. Standard virus samples

Rotavirus strains NCDV (G6, P[1]) and 69M (G8, P[10]) were used as positive controls. 69M strain was kindly provided by Dr. Tomás López (Instituto de Biotecnología-UNAM, Mexico) and RNA from the NCDV strain was isolated from the commercial vaccine Scourguard[®] K/C (Pfizer, Co.). Presence and integrity of RNA were determined in 10% polyacrylamide gels.

2.4. Reverse transcription-PCR and multiplex PCR

2.4.1. VP7 gene

RT-PCR was performed as described elsewhere [16]. The generic primers Bov9Com5 and Bov9Com3 were used to amplify a 1011 bp fragment of the VP7 gene from segment 9 of the rotavirus genome. A second round of amplification was made using Bov9Com5 and a cocktail of genotyping primers specific for G6, G8 and G10 genotypes (multiplex PCR). Amplicons of the second round were analyzed by electrophoresis in 1.0% agarose gels. Amplification fragments of 450 bp were considered positive for G6, 224 bp for G8 and 665 bp for G10 genotypes. The nucleotide positions and the sequence of primers are shown in Table 1 [16].

2.4.2. VP4 gene

For P-typing, two strategies reported in the literature were used [16,17]. The first one, the BOV strategy, used two generic primers Bov4Com5 and Bov4Com3 to amplify a 856 bp fragment of the VP4 gene, followed by PCR with a cocktail of three typification primers for P[1], P[5] and P[11]. The second strategy (CON) used the generic

Table 2
Primers used to amplify VP4 gene fragments and for P-typing bovine group A rotavirus [16,17].

Primer name	Sequence	Location
VP4 amplification		
Bov4Com5	5'-TTCATTATGGGACGATTCACA-3'	1067–1088
Bov4Com3	5'-CAACCCGAGCTGATATATC-3'	1930–1909
Con3	5'-TGGCTTCGCTCATATACAGACA-3'	11–32
Con2	5'-ATTTCCGACCAITTTATAACC-3'	868–887
P-typing		
P1	5'-TTAAATTCATCTCTTAGTTCTC-3'	1526–1505
P5	5'-GGCCGCATCGGATAAAGAGTCC-3'	1725–1704
P11	5'-TTCAGCCGTTGCGACTTC-3'	1398–1377
Con(P1)	5'-CGAACGCGGGGTGGTAGTTG-3'	269–289
Con(P5)	5'-GCCAGGTGTCGCATCAGAG-3'	336–354
Con(P11)	5'-GGAACGTATTCTAATCCGGTG-3'	574–594

primers Con2 and Con3 for amplifying a fragment of the VP4 gene, and Con(P1), Con(P5) and Con(P11) primers for P-typing. A third strategy (HYBR) combined primers of the two previous strategies, fragment amplification with the generic primers Bov4Com3 and Con3, and P-typing with primers Con(P1), Con(P5) and Con(P11). Expected amplicons from all of these primer combinations are outlined in Fig. 1. The nucleotide positions and sequences of primers are shown in Table 2.

2.5. Sequence analysis

After purification in Wizard Clean-up PCR columns (Promega, Madison, WI, USA), the amplicons of multiplex PCR reactions were sequenced in an Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer (Perkin Elmer/Applied Biosystems division, IBT-UNAM sequencing Unit). Sequence analyses were performed with Chromas software (Technelysium Pty, Ltd.). Initial identification of sequences was done using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) as implemented at the NCBI web server [18]. Sequences were clustered in accordance to the set of oligonucleotides used in the PCR amplifications and then Multiple Sequence Alignments of the corresponding groups were performed using the ClustalW2 program as implemented at the EBI [19].

3. Results

Twelve of the 128 field samples collected from animals involved in outbreaks of neonatal calf diarrhea between November 2005 and

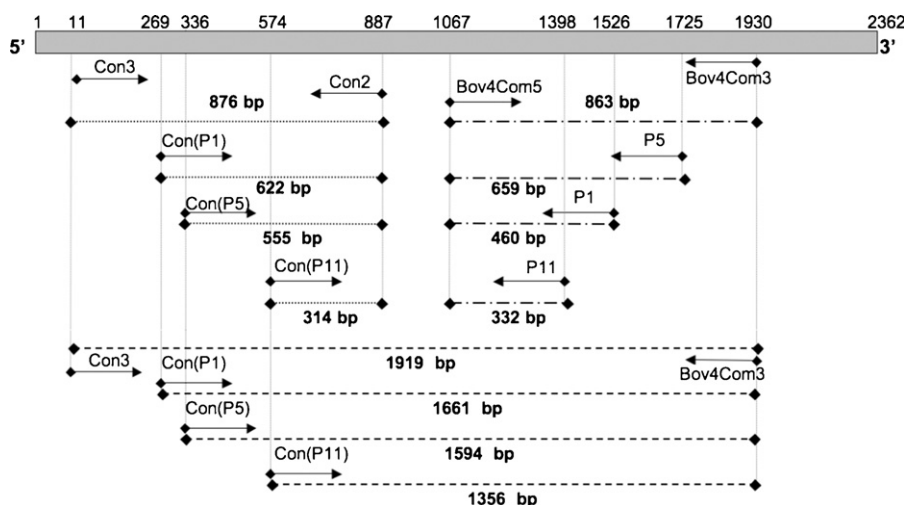
**Fig. 1.** Rotavirus gene VP4. Location of utilized PCR primers and expected lengths of amplified fragments are shown. CON (···), BOV (---) and HYB (—) strategies are shown.

Table 3
List of group A rotavirus positive samples and genotypification results.

Sample	Animal age, d	Region	G genotype	P genotype
14	U	Jalisco	G10	P[11]
19	8	Aguascalientes	G10	P[11]
47	16	Hidalgo	G6	P[5]
49	14	Hidalgo	G10	P[5]
50	11	Hidalgo	G6	P[5]
58	14	Hidalgo	G6	P[5]
61	U	Durango	G10	P[11]
75 ^b	14	Chihuahua	G10	P[11]
76 ^b	42	Chihuahua	G10	P[11]
80 ^c	8	Chihuahua	G10	P[11]
127 ^b	5	Baja California	G10	P[11]
128 ^b	7	Baja California	G10	P[11]
NCDV ^a	–	–	G6	P[1]
69M ^a	–	–	G8	ND

U: unknown; ND: not determined.

^a Positive control strains.

^b Vaccinated dams.

^c Not vaccinated.

June 2006 were positive for group A rotavirus, and are listed in Table 3. Rotavirus was found in 7 of the 10 sampled regions. Positive samples that originated from 26 dairy and/or beef herds were analyzed. Positive animals for Group A rotavirus were between 2 and 45 days of birth. Some of the animals found to be negative for group A rotavirus were sampled between 45 and 90 days of birth.

Rotavirus genotypes in positive samples were identified (Table 3). G-typing revealed that VP7 in 75.0% (9/12) of samples were G10 and 25.0% were G6 (Fig. 2). Genotype G8 was not detected in any field samples. 66.7% (8/12) of the positive samples were P[11] and 33.3% (4/12) were P[5] (Fig. 3). All P genotypes were confirmed with all the primer combinations shown in Fig. 1. No field samples contained the P[1] genotype. The G and P genotypes found were distributed in three binary combinations: G10, P[11] in 66.7% (8/12) of positive samples, G6, P[5] in 25.0% (3/12), and G10, P[5] in 8.3% (1/12). One-third of the positive samples, all with the G10, P[11] genotype, were isolated from calves whose mothers had been vaccinated with inactivated NCDV (G6, P[1]). No coinfections with more than one of the screened rotavirus genotypes were found. Positive controls confirmed the suitability of the methodology

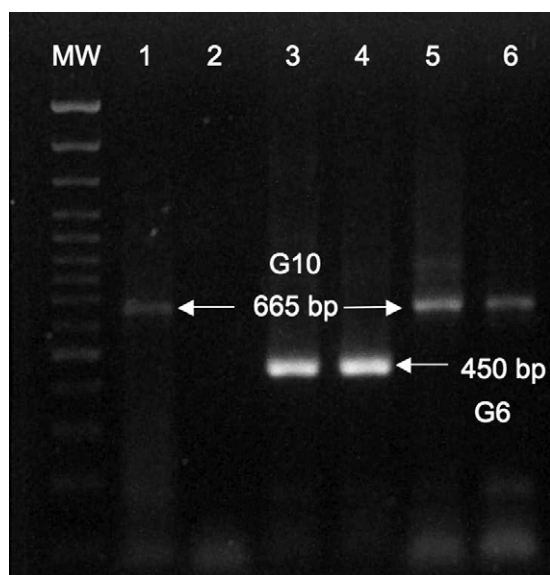


Fig. 2. G-typing: multiplex PCR of six field samples. A 1% agarose gel of the amplifications is shown. Lanes: MW, 100 bp marker with 500 bp highlighted; 1, 3, 4, 5 and 6: positive samples for group A rotavirus, 2: negative control (negative field sample).

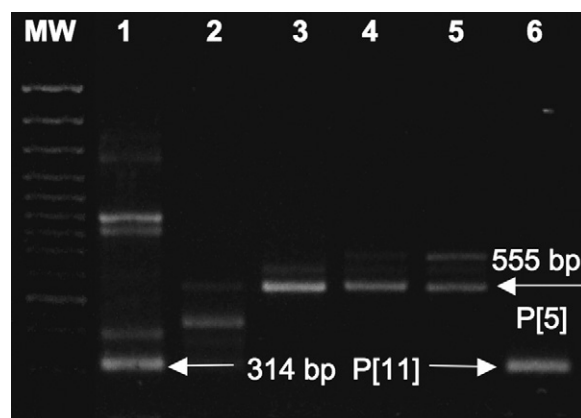


Fig. 3. P-typing: multiplex PCR of six field samples. Lanes: MW, 100 bp marker with 500 bp highlighted; 1–6: positive samples for group A rotavirus.

used for detecting rotavirus genotypes not found in field samples (Table 3).

To confirm genotypification, representative amplicons of multiplex PCR were sequenced and compared to databases. Field samples with the G10, P[11] genotype were similar to the B223 rotavirus strain (G10, P[11]) in 95.0% for VP7 and 88.3% for VP4. The VP7 (G6) gene present in the isolated samples had a similarity of 96% with the UK rotavirus strain (G6, P[5]), while the VP4 P[5] gene found in this work was similar in 89% with the 61A rotavirus strain (G10, P[5]). All sequence alignments and comparison confirmed the assigned genotype.

VP7 genes from samples 19 (G10) and 50 (G6) were completely sequenced, and submitted to GenBank with accession numbers FJ217204 and FJ217205, respectively. As expected, VP7 genes in both samples were similar to VP7 genes of their assigned genotype. Sample 19 had the highest identity with VP7 genes of strains B223 (96%) and 2292B (95%), and sample 50 was similar to VP7 in strains UK (95%) and IND (94%). As VP7 sequences found in both samples were different to those in GenBank, samples 19 and 50 were named strains MX001 and MX002, respectively.

The deduced amino acid sequences of VP7 (G6 and G10) were compared with other reported sequences. The highest sequence similarity of VP7 (G6) was with bovine strain UK (97%), while VP7 (G10) had the highest similarity with the bovine strain B223 (97%). Both sequences have a potential N-glycosylation site in Asn 69, which is present in most rotavirus strains [8]. Other potential N-glycosylation sites were found in both proteins: VP7 (G10) had an additional site in Asn 145, and VP7 (G6) had two additional sites in Asn 237 and 317.

4. Discussion

In this work, 128 faecal samples from calves were screened. Only 10% of the samples were positive for group A rotavirus, which contrasts with 44.2% of rotavirus incidence found in other studies (<http://www.inta.gov.ar>). The lower incidence found here is probably caused by the age of the animals, as negative samples were from animals between 45 and 90 days of age. In rotavirus-positive regions, the incidence was higher than 30%. All rotavirus-positive samples could be genotyped with the strategy used here, confirming that the genotypes found were those typical of bovine rotavirus. The G10, P[11] and G6, P[5] genotype combinations were the most frequently found. Similar results have been obtained in studies in the United States and Canada, where genotypes G6 and G10 combined with P[5] and P[11] were found in over 90% of bovine rotavirus samples [20,21]. Other studies have found a higher incidence of the G6, P[5] genotype, in comparison with G10, P[11] [4,10–14].

It is important to establish an epidemiologic surveillance and control of bovine rotavirus infection, as it has been shown that protection between genotypes is limited and available vaccines sometimes do not provide cross-protection [22]. It was found that the commercial vaccine containing genotypes G6, P[1] provided only partial heterotypic immunity against the G10, P[11] genotype. Other studies have also found that vaccination with a G6, P[1] vaccine does not provide protection against G6 rotavirus strains containing P genotypes different to P[1] [22,23].

The number of samples in this work in relation to the bovine population in Mexico and the prevalence of each genotype implies that the results obtained here are within 23% and 26% of error, with a confidence of 95% [24]. Therefore, at least the G10, P[11] combination can be considered as representative in the bovine population in Mexico. The results reported here can be used for designing appropriate vaccines for the region [22], although further genotyping studies are desirable.

Acknowledgments

Financial support by CONACyT-SAGARPA 2004-c01-103, CONACyT-Salud 2007-c01-69911, and PAPIIT-UNAM IN-223805 and IN-206407. Helpful discussions with Prof. E. Merino and E. Rodríguez-Amaro. Technical assistance by V. Hernández. W. Rodríguez-Limas graduate studies were supported by Sistema Nacional de Investigadores 8375.

References

- [1] Parwani AV, Tsunemitsu H, Saif LJ. Current research in bovine groups A and C rotaviruses. *Curr Top Vet Res* 1994;1:115–32.
- [2] Saif LJ, Fernández FM. Group A rotavirus veterinary vaccines. *J Infect Dis* 1996;174:S98–106.
- [3] Estes MK, Kapikian AZ. Rotaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Publishers; 2007. p. 1918–74.
- [4] Falcone E, Tarantino M, Di Trani L, Cordioli P, Lavazza A, Tollis M. Determination of bovine rotavirus G and P serotypes in Italy by PCR. *J Clin Microbiol* 1999;37:3879–82.
- [5] Liprandi F, Gerder M, Bastidas Z, López JA, Pujol H, Ludert JH, et al. Novel type of VP4 carried by a porcine rotavirus strain. *Virology* 2003;315:373–80.
- [6] McNeal MM, Sestak K, Choi AHC, Basu M, Cole MJ, Aye PP, et al. Development of a rotavirus-shedding model in rhesus macaques, using a homologous wild-type rotavirus of a new P genotype. *J Virol* 2005;79:944–54.
- [7] Martella V, Ciarlet M, Bányai K, Cavalli A, Corrente M, Elia G, et al. Identification of a novel VP4 genotype carried by a serotype G5 porcine rotavirus strain. *Virology* 2006;346:310–1.
- [8] Khamrin P, Maneekarn N, Peerakome S, Chan-it W, Yagyu F, Okitsu S, et al. Novel porcine rotavirus of genotype P[27] shares new phylogenetic lineage with G2 porcine rotavirus strain. *Virology* 2007;361:243–52.
- [9] Gentsch JR, Woods PA, Ramachandran M, Das BK, Leite JP, Alfieri A, et al. Review of G and P typing results from a global collection of rotavirus strains: implications for vaccine development. *J Infect Dis* 1996;174:S30–6.
- [10] Barreiros MA, Alfieri AF, Médiçi KC. G and P genotypes of group A rotavirus from diarrhoeic calves born to cows vaccinated against the NCDV (P[1], G6) rotavirus strain. *J Vet Med* 2004;B51:104–9.
- [11] Suzuki Y, Sanekata T, Sato M, Tajima K, Matsuda Y, Nakagomi O. Relative frequencies of G (VP7) and P (VP4) serotypes determined by polymerase chain reaction assays among Japanese bovine rotaviruses isolated in cell culture. *J Clin Microbiol* 1993;31:3046–9.
- [12] Alfieri AF, Alfieri AA, Bacellar MA, Gagliardi JP, Richtzenhain LJ. G and P genotypes of group A rotavirus strains circulating in calves in Brazil, 1996–1999. *Vet Microbiol* 2004;99:167–73.
- [13] Fukai K, Maeda Y, Fujimoto K, Itou T, Sakai T. Changes in the prevalence of rotavirus G and P types in diarrhoeic calves from the Kagoshima prefecture in Japan. *Vet Microbiol* 2002;86:343–9.
- [14] Wani SA, Bhat MA, Ishaq SM, Ashrafi MA. Determination of bovine rotavirus G genotypes in Kashmir, India. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 2004;23:931–6.
- [15] Lu W, Duhamel GE, Benfield DA, Grotelueschen M. Serological and genotyping characterization of group A rotavirus reassortants from diarrhoeic calves born to dams vaccinated against rotavirus. *Vet Microbiol* 1994;42:159–70.
- [16] Isegawa Y, Nakagomi O, Nakagomi T, Ishida S, Uesugi S, Ueda S. Determination of bovine rotavirus G and P serotypes by polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes* 1993;7:277–84.
- [17] Gouvea V, Santos N, Timenetsky MC. VP4 typing of bovine and porcine group A rotaviruses by PCR. *J Clin Microbiol* 1994;32:1333–7.
- [18] Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997;25(17):3389–402.
- [19] Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, et al. ClustalW2 and ClustalX version 2. *Bioinformatics* 2007;23(21):2947–8.
- [20] Chang KO, Parwani AV, Saif LJ. The characterization of VP7 (G type) and VP4 (P type) genes of bovine group A rotaviruses from field samples using RT-PCR and RFLP analysis. *Arch Virol* 1996;141:1727–39.
- [21] Hussein HA, Cornaglia E, Saber MS, El-Azhary Y. Prevalence of serotypes G6 and 10 group A rotaviruses in dairy calves in Quebec. *J Vet Res* 1995;59:235–7.
- [22] Kim Y, Nielsen PR, Hodgins D, Chang KO, Saif LJ. Lactogenic antibody responses in cows vaccinated with recombinant bovine rotavirus-like particles (VLPs) of two serotypes or inactivated bovine rotavirus vaccines. *Vaccine* 2002;20:1248–58.
- [23] Kimberly JC, Tanya JT, Zhichang X, Mann FE, Bonnot CE, Woode GN. An unusual group A rotavirus associated with an epidemic of diarrhea among 3-month-old calves. *Ruminants* 1996;208:552–4.
- [24] Mateu E, Casal J. Tamaño de la muestra (Spanish). *Rev Epidemiol Med Prev* 2003;1:8–14.

ANEXO F. Artículo *in extenso*

Rodriguez-Limas WA, Folch-Mallol, JL., Ramírez OT, Palomares LA. Construction of different strains of *Saccharomyces cerevisiae* for rotavirus protein expression. En las memorias del First International Congress on Biotechnology and Bioengineering.

ISBN 978.607.95065.1.3

CONSTRUCTION OF DIFFERENT STRAINS OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* FOR ROTAVIRUS PROTEIN EXPRESSION

Rodríguez-Limas, W.A., Folch-Mallol, J.L., Ramírez, O.T., Palomares, L.A.*

Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. e-mail: william@ibt.unam.mx, tonatiuh@ibt.unam.mx, laura@ibt.unam.mx

ABSTRACT

The cattle industry is often affected by neonatal diarrhea, mostly caused by rotavirus, of which calves, piglets, young ovines, and goats are victims. Recombinant vaccines based on virus like particles (VLP) can prevent diseases. Several groups have shown that VLP inoculated into pregnant animals induce high antibody responses in mammary secretions; calves fed with colostrum or milk from vaccinated animals are protected from diarrhea following rotavirus challenge. In this work, *Saccharomyces cerevisiae* wild type W3031a was transformed with three different vectors (pRS2, pRS7 and pSal4) containing the VP2, VP6 and VP7 genes, respectively. In the pRS vectors, genes are under the PMA1 promoter, which is the constitutive promoter of the major yeast plasma membrane H⁺-ATPase gene. Vectors of the pSal series have the CUP promoter, which is inducible with micromolar amounts of CuSO₄. Expression of VP7 can be regulated with different concentrations of. The yeast strains generated can simultaneously express one, two or three rotavirus proteins, using three auxotrophy markers (Leu2, Ura3 and Trp1).

MATERIALS AND METHODS

Gene selection

VP2

The VP2 gene was amplified from messenger RNA of insect cells expressing VP2 from rotavirus strain RF. The primers used for amplification are listed in Table 1.

VP6

Rotavirus dsRNA (strain NCDV) was isolated from a sample of NCDV rotavirus using the QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Westburg, Holland), as described by the manufacturer. Segment 6 was amplified by RT-PCR; a 1326 bp product was obtained using primers shown in Table 1.

VP7

Segment 9 of bovine rotavirus was isolated from faecal samples in a previous work (Rodríguez-Limas et al., 2008). Two field samples MX001 and MX002 (GenBank accession nos. FJ217204 and FJ217205) that contain the G6 and G10 genotypes of VP7 glycoprotein were isolated and amplified by RT-PCR reactions. Amplicons of 1062 bp were obtained using primers previously reported (Isegawa, et al. 1993).

Table 1. Oligonucleotides used to amplify rotavirus genes

Primer name	Sequence	Position	Product obtained
5' VP2HINDIII	5'>GTACCAAGCTTAGAAGGTTCAATGGCG< 3'	9-28	VP2
3' VP2	5'>GGTTGGCGTTTACAACCTCGT< 3'	2668-2649	2660 bp
5' VP6	5'>TTTAAACGAAGTCTTCAACATGGAT<3'	5-29	VP6
3' VP6	5'>TGAGTGATTACTCTGTGTAGCGAAT<3'	1331-1306	1326 bp
Beg9-5	5'>GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTTTGG< 3'	1-28	VP7
Bov9Com3	5'>TCACATCATACTAATCT< 3'	1,039-1,060	1060 bp

Cloning strategies

VP2 Gene

The PCR product of VP2 (2660 bp) was ligated into a pJet1 vector (Fermentas Inc., Glen Burnie, USA). Recombinant *E. coli* cells were screened by colony PCR. Positive clones were grown overnight in Luria Bertani medium supplemented with 100 µg/mL of ampicillin, 37 °C, 200 rpm. Next day, plasmids were extracted using QIAprep® Spin Miniprep kit (Qiagen) and selected based on restriction enzyme pattern analysis. For this purpose, HindIII and SacI were used in parallel to confirm cloning and orientation of VP2 gene. Positive clones were sequenced in an Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer (Perkin Elmer/Applied Biosystems division, IBT-UNAM sequencing Unit). Initial identification of sequences was done using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) as implemented at the NCBI web server (Altschul et al., 1997). Generated vector pJVP2RF was digested using XhoI and NcoI and subcloned into the pRS2 vector (Mascorro-Gallardo *et al.*, 1996). This shuttle vector has the LEU2 gene that supplements leucine auxotrophy and a sequence of the 2-µm plasmid that permits a high plasmid copy number.

VP6 gene

The VP6 gene was cloned in the One Shot® Match1®-T1^R *E. coli* strain (Invitrogen) using the TOPO®BluntII vector (Invitrogen), according to manufacturer's directions. Recombinant bacterias were analyzed by colony PCR. Positive clones were sequenced at the IBT-UNAM Sequencing Unit. The resulting pTVP6 was digested with XhoI and SacI and subcloned into the pRS7 plasmid (Mascorro-Gallardo *et al.*, 1996). This shuttle vector has the TRP1 gene that supplements tryptophan auxotrophy.

VP7 genes

Segment 9 of bovine rotavirus strains MX001 and MX002 were cloned in the pCR2.1 vector (Invitrogen). Positive colonies were analyzed by PCR, restriction enzyme pattern analysis and sequencing. Generated vectors were called pVP7G6 and pVP7G10 and were digested and subcloned into the multiple cloning site (MCS) of the pSal4 vector in XhoI and SacI sites.

Yeast transformation

Saccharomyces cerevisiae wild type W3031a (MATa ura3-1 ade2-1 leu2,3-112 trp1-1 his3-11,15) was transformed using lithium acetate technique. Briefly, 5 mL of YPD medium (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose) were inoculated with a single yeast colony and incubated overnight on a rotary shaker at 200 rpm and 30 °C. Next day, OD₆₀₀ was measured and a new culture of 50 mL was prepared and inoculated to obtain 0.3 units of OD₆₀₀. This culture was grown until 0.6 units of OD₆₀₀ and centrifuged at 3,000 g for 5 min at 20 °C. Cells were resuspended in 1.0 mL of 100mM lithium acetate and aliquoted in volumes of 100 µL.

Carrier DNA (ss-DNA of salmon sperm 10 mg/mL) was denatured at 95 °C for 5 min and then kept on ice until use. Basic transformation mix consisted of: 240 µL of polyethylene glycol 3350 (50% w/v), 36 µL of 1.0 M LiAc, 50 µL ss-DNA (10 mg/mL), 4 µL DNA and 30 µL of sterile ddH₂O. Mixture was vortexed vigorously for 1 min and heated for 40 min at 42 °C. Cells were centrifuged at 13,000 g for 15 s. Transformed yeasts were plated in 3 different dilutions onto the appropriate selection medium. Plates were incubated at 30°C for 3-4 days and selected to verify protein expression.

Cell culture

Yeast strains were grown in minimal medium (6.7g/L Yeast Nitrogen Base, Sigma-Aldrich Co., Cat No. Y1250, 20 g/L glucose) for strain selection and complete medium YPD (10 g/L yeast extract, 20 g/L peptone, 20 g/L glucose) for protein expression. Yeast strains with pSal4VP7 plasmids were also supplemented with 100mM CuSO₄ to induce protein expression. Yeasts were cultivated in 500 mL baffled flasks with 100 mL of working volume at 30°C and 200 rpm. Kinetics and protein expression were followed for 48 h, or until carbon source depletion.

RESULTS AND DISCUSSION

Amplification of VP2 gene

Total RNA of infected insect cells was extracted as described before. Integrity of RNA was checked by 1% agarose gel. Figure 1 shows the obtained results:

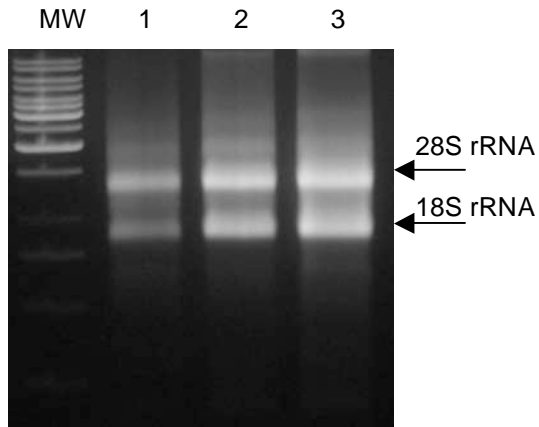


Figure 1. Total RNA extracted from insect cells infected with BacVP2 RF. MW: 1 KB DNA ladder (New England Biolabs). Lane 1: Total RNA 24 h.p.i. Lane 2: Total RNA 36 h.p.i. Lane 3: Total RNA 48 h.p.i.

Reverse transcriptase reactions were performed followed by PCR reactions. VP2 gene was isolated from agarose gels (Figure 2).

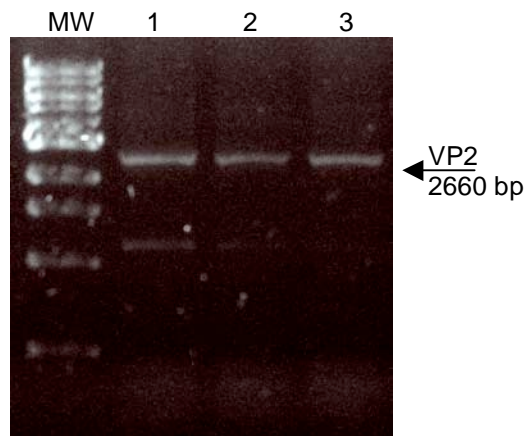
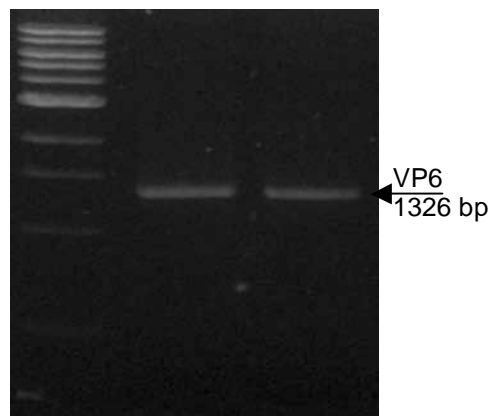


Figure 2. PCR products of VP2 amplification. MW: DNA ladder 1 KB (Fermentas, Inc) Lane 1: RT PCR 24 h.p.i. Lane 2: RT PCR 36 h.p.i. Lane 3: RT PCR 48 h.p.i.

Amplification of VP6 gene

RT-PCR reactions from viral dsRNA were performed. A product of 1326 bp was obtained (Fig. 3).

Figure 3. PCR products of VP6 amplification. MW: DNA ladder 1 KB (Fermentas, Inc) Lane 1 and 2: RT PCR reaction from two different dsRNA isolates



Amplification of VP7 genes

Genotypes G10 and G6 of VP7 were amplified from dsRNA field samples. These strains were obtained in a previous work (Rodriguez-Limas *et al.*, 2008). PCR products of these samples were isolated from 1% agarose gels (Fig. 4).

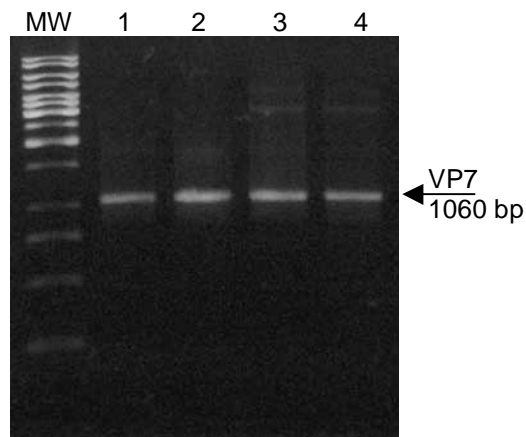


Figure 4. VP7 amplification. PCR reactions. *MW*: 1 KB DNA ladder (New England Biolabs). *Lane 1*: PCR reaction from dsRNA G10 genotype, *Lane 2*: PCR reaction from dsRNA G6 genotype, *Lane 3*: PCR from pCR8G10 plasmid, *Lane 4*: PCR from pCR8G6 plasmid.

Cloning strategy

For illustration purposes, VP6 cloning strategy is shown in the figure 5. Similar strategies were performed for VP2 and VP7 (G10 and G6) genes:

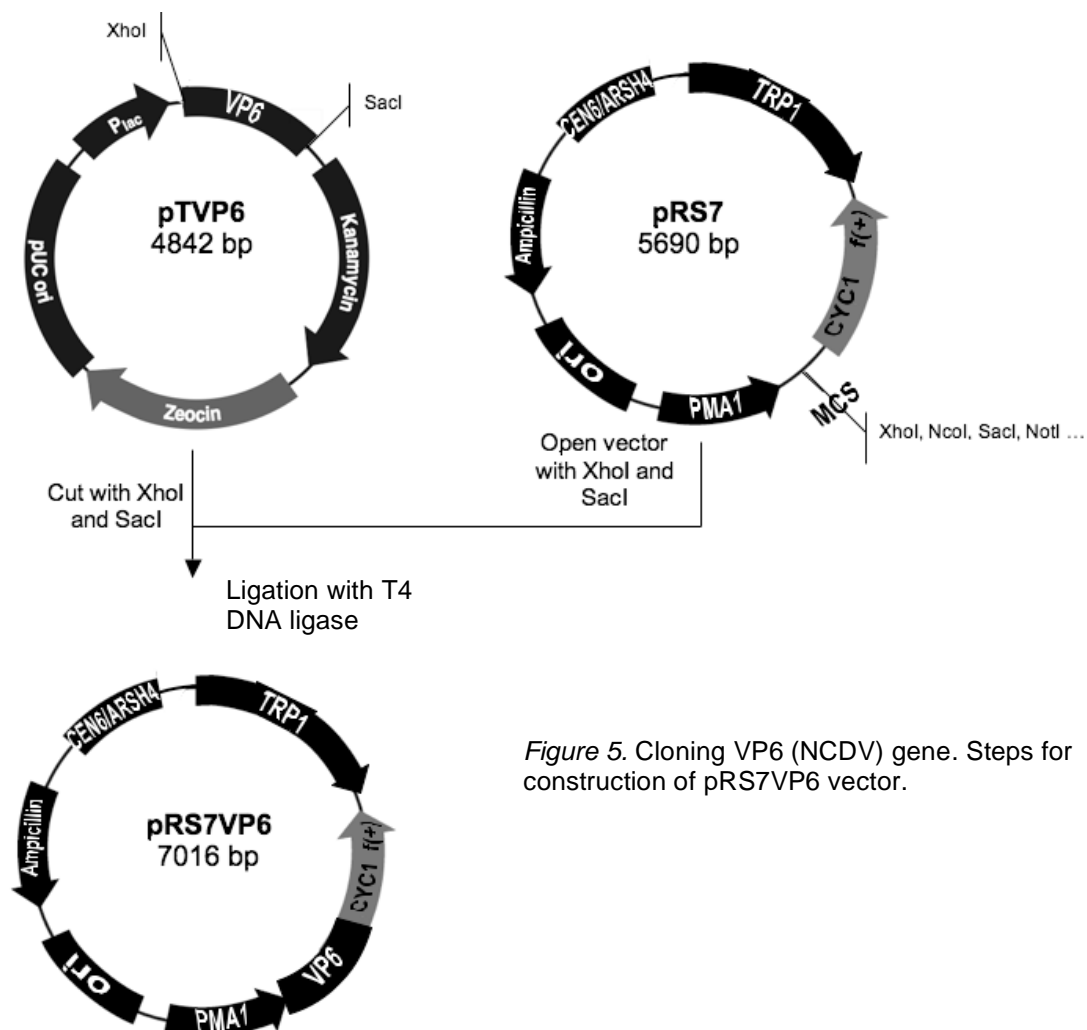


Figure 5. Cloning VP6 (NCDV) gene. Steps for construction of pRS7VP6 vector.

Integrity, quantification and size of the digestion products were analyzed using agarose gels. Afterwards, ligation with T4 DNA ligase was performed in a molar ratio 1:3 (vector: insert), for 16 h at 12 °C. One Shot® Match1®-T1^R *E. coli* strain was transformed by heat shock at 42 °C for 1 min. Transformed cells were plated in LB agar medium with ampicillin. Clone selection was made by colony PCR. Figure 6 shows 10 colonies. Nine of them contained the VP6 gene.

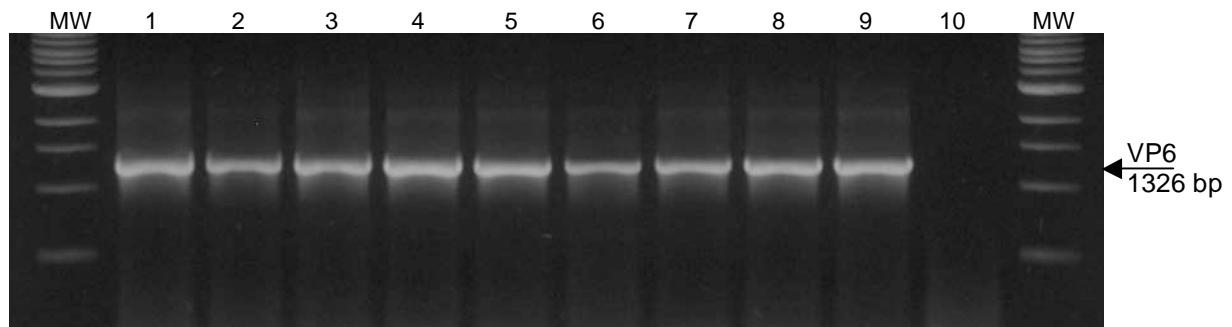


Figure 6. Screening of VP6 gene in *E. coli* colonies with pRS7VP6 plasmid. MW: 1 Kb DNA ladder (Fermentas, Inc). Lanes 1–10: PCR amplification of VP6 gene

The PRS7VP6 plasmid was digested to verify the correct orientation (data not shown). Genes were sequenced before transformation. Yeasts were transformed as described in Materials and Methods section. VP6 expression was verified by Western blot analysis (Fig. 7).

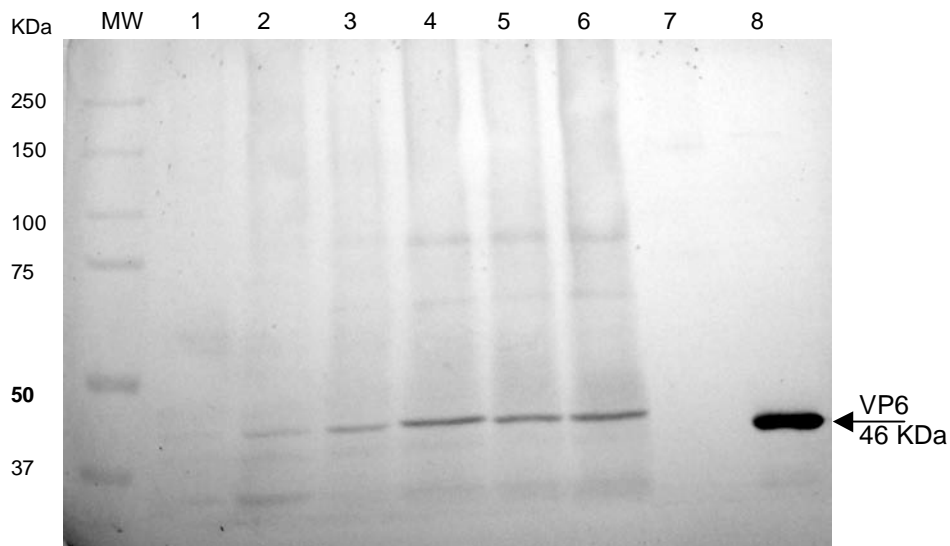


Figure 7. Western Blot for VP6 identification. Primary antibody: Rabbit-anti rotavirus YM (1:2000), Secondary antibody: Anti-rabbit HRP (1:2000). MW: Dual color protein ladder (BioRad). Lanes 1-6: VP6 at different culture times, 10, 12, 24, 31, 36 and 48 hours. Lane 7: Negative control (Culture supernatant). Lane 8: Positive control (VP6 produced in insect cells).

CONCLUSIONS

Our research group has constructed different yeast that can express one, two or three rotavirus proteins, using three auxotrophy markers (Leu2, His3 and Trp1). These proteins can be used as vaccines or diagnostics. Currently, we are evaluating the simultaneous expression of two or three proteins of rotavirus in yeasts. Yeast expression is an economic system more easily scalable to industrial level in comparison with mammalian or insect cells and could be a feasible alternative for veterinary vaccine production.

REFERENCES

Isegawa Y, Nakagomi O, Nakagomi T, Ishida S, Uesugi S, Ueda S. Determination of bovine rotavirus G and P serotypes by polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes* 1993; 7: 277-284.

Mascorro-Gallardo JO, Covarrubias AA, Gaxiola R. Construction of a CUP1 promoter-based vector to modulate gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 1996; 172: 169-170

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, and Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 1997; 25(17): 3389-3402.

Rodríguez-Limas WA, Flores-Samaniego B, De la Mora G, Ramírez OT, Palomares LA. (2008). Genotypification of Bovine Group A Rotavirus in Mexico. *Vaccine*. (Submitted)