



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Clonación, sobre-expresión y purificación de las
proteínas NSP5 y NSP6 de rotavirus en
Escherichia coli”**

Tesis que presenta

Midory Samaniego Hernández

Para obtener el grado de

Doctora en Ciencias en Biología Molecular

Directora de la tesis:

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa

San Luis Potosí, S.L.P., enero del 2007



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "**Clonación, sobre-expresión y purificación de las proteínas NSP5 y NSP6 de rotavirus en *Escherichia coli***" presentada para obtener el Grado de Doctora en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Midory Samaniego Hernández** y aprobada el **5 de enero del 2007** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa
(Directora de la tesis)

Dr. Antonio de León Rodríguez
(Asesor de la tesis)

Dra. Leticia Santos Martínez
(Sinodal)

Dra. Imelda Bonifas Arredondo
(Sinodal)



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Proteómica y Expresión Génica de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección de la Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa y la asesoría del Dr. Antonio de León Rodríguez.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología 172281 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

Proyecto apoyado por Fondo CONACYT (33151-N).



IPICYT

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 005 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Doctorado en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 5 días del mes de enero del año 2007, se reunió a las 16:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Antonio De León Rodríguez	Presidente	IPICYT
Dra. Imelda Bonifas Arredondo	Secretaria	IPICYT
Dra. Ana Paulina Barba De la Rosa	Sinodal	IPICYT
Dra. Martha Leticia Santos Martínez	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Midory Samaniego Hernández

sobre la Tesis intitulada:

Clonación, Sobre-Expresión y Purificación de las Proteínas NSP5 Y NSP6 de Rotavirus en Escherichia coli

que se desarrolló bajo la dirección de:

Dra. Ana Paulina Barba De la Rosa

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 17:45 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fé el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 5 días del mes enero de 2007.


Dr. Marcial Bonilla M.
Secretario Académico



L.C.C. Ivonne Lizette Cuevas Velez
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares



Contenido

	Página
Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Lista de Tablas	ix
Lista de Figuras	x
Resumen	xiii
Abstract	xiv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Los rotavirus	1
1.1.1 Importancia de los rotavirus	1
1.1.2 Gastroenteritis causada por rotavirus	3
1.1.3 Estructura de los rotavirus	5
1.1.4 Clasificación de los rotavirus	10
1.1.5 Ciclo replicativo de los rotavirus	12
1.1.6 Vacunas contra rotavirus	14
1.1.6.1 Descripción de algunas vacunas contra rotavirus	16
1.1.7 Proteínas NSP5 y NSP6	18
1.1.7.1 NSP5	18
1.1.7.2 NSP6	20
1.2 Producción de proteínas recombinantes	21
1.2.1 <i>Escherichia coli</i>	21
1.2.2 Chaperonas moleculares	22

	Página
1.2.2.1 Sistema GroE	23
1.3 Purificación de proteínas recombinantes	25
1.3.1 Cromatografía por afinidad	26
1.4 Cristalización	28
1.4.1 Difusión en vapor (sitting-drop)	28
1.4.2 Difusión líquido-líquido	30
2. OBJETIVOS	31
2.1 Objetivo general	31
2.2 Objetivos particulares	31
3. MATERIALES Y MÉTODOS	32
3.1 Estrategia experimental	32
3.2 Construcción de vectores de expresión	32
3.2.1 Metodología	35
3.2.1.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	35
3.2.1.2 Geles de agarosa al 0.8%	35
3.2.1.3 Digestión con enzimas de restricción	36
3.2.1.4 Ligación	36
3.2.1.5 Células competentes (Método cloruro de rubidio)	36
3.2.1.6 Transformación (Choque térmico)	36
3.2.1.7 Minipreparaciones (Birnboim y Doly)	37
3.2.1.8 Respaldos en glicerol	37
3.3 Expresión	38
3.3.1 Metodología	38
3.3.1.1 Ensayos de expresión (5 mL)	38

	Página
3.3.1.2 Ensayos de expresión (25 mL)	39
3.3.1.3 Ensayos de expresión (500 mL)	39
3.3.1.4 Preparación de geles de archilamida Tris-Tricina 4 y 15% (SDS-PAGE)	40
3.3.1.5 Tinción de geles de poliacrilamida (Coomassie)	40
3.3.1.6 Densitometría	40
3.3.1.7 Cuantificación de proteína (Bradford)	40
3.3.1.8 Análisis Western blot	40
3.4 Purificación	42
3.4.1 Metodología	42
3.4.1.1 Purificación pTrcHis2 B (resina ProBond)	42
3.4.1.2 Purificación pGEX-6P-1 (resina Glutathione Sepharose 4B)	42
3.5 Análisis de actividad	44
3.5.1 Metodología	44
3.5.1.1 Ensayo de actividad ATPasa	44
3.5.1.2 Ensayo de actividad ATPasa en gel	44
3.6 Cristalización	46
3.6.1 Metodología	46
3.6.1.1 Ensayos de cristalización	46
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
4.1 Clonación	47
4.1.1 Construcción de vectores en pTrcHis2 B	47
4.1.2 Construcción de vectores en pGEX-6P-1	48
4.1.3 Co-transformantes con el vector pGroES-GroEL	49

	Página
4.2 Expresión	51
4.2.1 Expresión NSP5 y NSP6 en pTrcHis2 B	51
4.2.2 Expresión NSP5 y NSP6 en pTrcHis2 B / pGroES-GroEL	54
4.2.3 Expresión NSP5 y NSP6 en pGEX-6P-1	56
4.2.4 Expresión NSP5 y NSP6 en pGEX-6P-1 / pGroES-GroEL	57
4.2.5 Comparación de los diferentes sistemas de expresión de las proteínas NSP5 y NSP6	58
4.3 Purificación	60
4.3.1 Purificación de la expresión NSP5 y NSP6 en pTrcHis2 B	60
4.3.2 Purificación de la expresión NSP5 y NSP6 en pGEX-6P-1	61
4.3.3 Comparación de la purificación NSP5 y NSP6 entre los distintos vectores	62
4.4 Análisis de actividad	69
4.4.1 Ensayos de actividad ATPasa	69
4.4.2 Ensayo de actividad ATPasa en gel	71
4.5 Cristalización	73
5. CONCLUSIONES	74
6. REFERENCIAS	75
7. ANEXOS	80
7.1 Reactivos	80
7.2 Equipos	82
7.3 Cepas bacterianas	83
7.4 Características de los plásmidos utilizados	84
7.5 Soluciones stock	84
7.6 Medios y soluciones	85

Lista de Tablas

	Página
Tabla 1. Características de las proteínas estructurales (VP's)	8
Tabla 2. Características de las proteínas no estructurales (NSP's)	9
Tabla 3. Características de candidatos y vacunas contra rotavirus	15
Tabla 4. Oligonucleótidos empleados en la presente tesis	33
Tabla 5. Características de las construcciones realizadas	34
Tabla 6. Comparación de la expresión de las proteínas NSP5 y NSP6 entre vectores	58
Tabla 7. Comparación de la eficiencia de purificación entre los sistemas usados para la expresión de las proteínas NSP5 y NSP6	62
Tabla 8. Velocidad máxima de actividad ATPasa de varias proteínas	71
Tabla A1. Preparación de geles de acrilamida Tris-Tricina 4 y 15% (SDS-PAGE)	86
Tabla A2. Diluciones para la curva estándar de BSA	87
Tabla A3. Diluciones para la curva estándar de KH_2PO_4	88

Lista de Figuras

	Página
Figura 1. Causas principales de mortalidad en niños menores de cinco años en el año 2005	1
Figura 2. Incidencia estimada de la infección por rotavirus en el mundo con base en estudios publicados del 2000 al 2004	2
Figura 3. Estimación mundial de la distribución anual de muertes causadas por rotavirus con base en estudios publicados del 2000 al 2004	2
Figura 4. Microscopía electrónica de los rotavirus	6
Figura 5. Estructura de los rotavirus	7
Figura 6. Distribución mundial de los tipos G y P del grupo A de los rotavirus reportados entre 1989 – 2004	11
Figura 7. Distribución temporal del serotipo G9 de rotavirus en el mundo desde 1983	11
Figura 8. Ciclo de replicación de los rotavirus	13
Figura 9. Secuencia de nucleótidos del segmento 11 completo	18
Figura 10. Dominios estructurales y funcionales de las proteínas NSP5 y NSP6 de rotavirus	19
Figura 11. <u>Escherichia coli</u>	21
Figura 12. Ciclo de las chaperonas GroE	23
Figura 13. Principio de la separación por cromatografía de afinidad	26
Figura 14. Principio de la cristalización por el método de sitting-drop	29
Figura 15. Principio de la cristalización por el método de difusión líquido-líquido	30
Figura 16. Estrategia experimental empleada en la tesis	32
Figura 17. Plásmidos utilizados en la presente tesis	33
Figura 18. Plásmido pGroES-GroEL	35
Figura 19. Análisis en geles de agarosa de las construcciones NSP5 y NSP6 en pTrcHis2 B	48

	Página
Figura 20. Análisis en geles de agarosa de las construcciones NSP5 y NSP6 en pGEX-6P-1	49
Figura 21. Análisis en geles de agarosa de las construcciones NSP5 y NSP6 en pTrcHis2 B y pGEX-6P-1 con pGroES-GroEL	50
Figura 22. Análisis por SDS-PAGE de la expresión de las construcciones NSP5 y NSP6 en pTrcHis2 B en un primer escrutinio	51
Figura 23. Análisis por SDS-PAGE de las fracciones soluble e insoluble en Tris de la expresión de las construcciones NSP5 y NSP6 en pTrcHis2 B	52
Figura 24. Análisis por SDS-PAGE de la expresión de las construcciones NSP5 y NSP6 en pTrcHis2 B en un segundo escrutinio	53
Figura 25. Análisis por SDS-PAGE de las fracciones solubles en Tris o guanidina de la expresión de las construcciones NSP5 y NSP6 en pTrcHis2 B obtenidas después de la inducción	54
Figura 26. Análisis por SDS-PAGE de las fracciones soluble e insoluble en Tris de la expresión de las construcciones NSP5 y NSP6 en pTrcHis2 B / pGroES-GroEL	55
Figura 27. Análisis por SDS-PAGE de los extractos totales de la expresión de las construcciones NSP5 y NSP6 en pGEX-6P-1	56
Figura 28. Análisis por SDS-PAGE de las fracciones soluble e insoluble en Tris de la expresión de las construcciones NSP5 y NSP6 en pGEX-6P-1 / pGroES-GroEL	57
Figura 29. Purificación de las proteínas recombinantes NSP5 y NSP6 producidas en pTrcHis2 B por cromatografía de afinidad a metal	60
Figura 30. Análisis Western blot de las proteínas recombinantes puras NSP5 y NSP6 producidas en pTrcHis2 B	61
Figura 31. Ensayos de actividad ATPasa de las proteínas purificadas NSP5 y NSP6	69
Figura 32. Ensayo de actividad ATPasa de la proteína purificada NSP6	70

	Página
Figura 33. Ensayo de actividad ATPasa de la proteína purificada NSP6 en un rango de pH de 3.0 a 7.0	71
Figura 34. Ensayo de actividad ATPasa de la proteína purificada en un rango de pH de 3.0 a 7.0	71
Figura 35. Análisis de la actividad ATPasa en geles de agarosa de las proteínas NSP5 y NSP6 expresadas en pTrcHis2 B	72
Figura 36. Micro-cristales obtenidos con la proteína purificada NSP5 producida en la construcción pTrcHis2 B	73

Resumen

Clonación, sobre-expresión y purificación de las proteínas NSP5 y NSP6 de rotavirus en *Escherichia coli*

Los rotavirus representan una de las principales causas de gastroenteritis entre los niños menores de cinco años a nivel mundial. Son virus icosaédricos no envueltos que pertenecen a la familia *Reoviridae*. Cada segmento de su genoma de ácido ribonucleico de cadena doble (ARNcd) codifica para una proteína estructural (VP) o no estructural (NSP) con excepción del segmento 11 que codifica para dos proteínas (NSP5 y NSP6). NSP5 es una fosfoproteína implicada en la formación de viroplasmatas así como en la regulación del equilibrio traducción/replicación de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) viral. NSP6 podría tener una función regulatoria sobre NSP5. Sin embargo, no se ha reportado información estructural o funcional de las proteínas NSP5 y NSP6. El principal objetivo del presente trabajo fue la sobreexpresión y purificación de las proteínas NSP5 y NSP6 de rotavirus en *Escherichia coli*. Se utilizaron distintos sistemas de expresión: 1) fusión a 6XHis en el extremo C-terminal, y 2) fusión a GST en el extremo N-terminal. La fusión con 6XHis produjo 2% de proteína total de NSP5 y 11% de NSP6. En contraste, las proteínas GST-NSP5 y GST-NSP6 corresponden al 34 y 31% de las proteínas totales, respectivamente. Las fusiones con GST parecen tener un efecto de protección contra la toxicidad de las proteínas no estructurales de rotavirus en *Escherichia coli*. En ambos sistemas, las proteínas recombinantes se encontraron almacenadas como cuerpos de inclusión. Se determinaron las condiciones para la solubilización y purificación de las proteínas heterólogas y se obtuvieron cantidades adecuadas para la realización de análisis funcionales y ensayos de cristalización.

PALABRAS CLAVE: Cuerpos de inclusión, cristalización, solubilización.

Abstract

Clonation, over-expression and purification of the rotavirus proteins

NSP5 and NSP6 in *Escherichia coli*

Rotavirus is one of the worldwide leading causes of gastroenteritis in children under five years of age. They are icosahedral non-coated viruses that belong to *Reoviridae* family. Each segment of their double stranded ribonucleic acid (dsRNA) genome codes for a structural (VP) or nonstructural (NSP) protein, except the 11 segment that codes for two proteins: NSP5 and NSP6. NSP5 is a phosphoprotein involved in the viroplasm formation, as well as in the viral messenger ribonucleic acid (mRNA) translation/replication-regulation. NSP6 could have a regulatory function over NSP5. However, there is no information about the NSP5 and NSP6 structure of rotavirus proteins. The present work had the main objective the over-expression and purification of the NSP5 and NSP6 rotavirus proteins in *Escherichia coli*. Different plasmids were used: 1) the fusion to His-tag in the C-terminus, and 2) the fusion to GST to the N-terminus. NSP5-His-tag fusion was produced in only 2% of total protein; NSP6 was expressed in higher amounts (11% of total protein). In contrast, the GST-NSP5 and GST-NSP6 fusion proteins were about 34% and 31% of total protein content, respectively. GST fusions could have a protective effect against the toxicity of the rotaviral non-structural proteins over-expressed in *Escherichia coli*; however, in both systems, the recombinant proteins NSP5 and NSP6 were recovered as inclusion bodies. We have found the conditions for the solubilization and purification of the heterologous proteins. Amounts of the recombinant proteins were enough to perform functional studies and crystallization assays.

KEY WORDS: Crystallization, inclusion bodies, solubilization.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 LOS ROTAVIRUS

1.1.1 Importancia de los rotavirus

Las enfermedades diarreicas representan la segunda causa de las casi 11 millones de muertes que ocurren anualmente en niños menores de cinco años de edad (Figura 1).

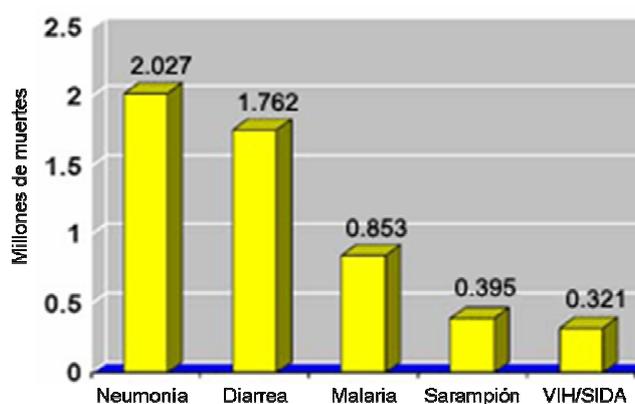


Figura 1. Causas principales de mortalidad en niños menores de cinco años en el año 2005 (Rotavirus Vaccine Program 2006).

Aunque más de 20 microorganismos diferentes causan diarrea (bacterias, parásitos y virus), los rotavirus son la causa más común de gastroenteritis severa a nivel mundial, representado del 29 al 45% de las aproximadamente 1.8 millones de muertes (Kombo y col. 2001; Glass y col. 2006; Rotavirus Vaccine Program 2006).

Los rotavirus infectan prácticamente a todos los niños en sus primeros cinco años de vida (Figura 2) y aunque la mayoría de las infecciones provocan ligeros síntomas, del 15-20% de los niños infectados requieren tratamiento en una clínica y del 1-3% requieren ser hospitalizados por deshidratación (Glass y col. 2006).

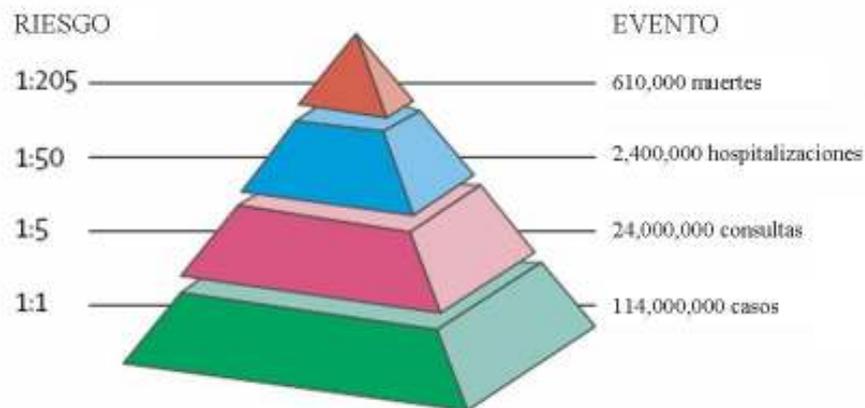


Figura 2. Incidencia estimada de la infección por rotavirus en el mundo con base en estudios publicados del 2000 al 2004 (Glass y col. 2006).

La gastroenteritis causada por rotavirus es responsable de aproximadamente el 5% de la mortalidad total entre niños menores de cinco años de edad. Más del 80% de dichas muertes se producen en países del sur de Asia y África (Glass y col. 2006; Parashar y col. 2006) (Figura 3). En Latinoamérica se estiman entre 75,000 y 15,282 muertes anuales (Organización Panamericana de la Salud 2003).

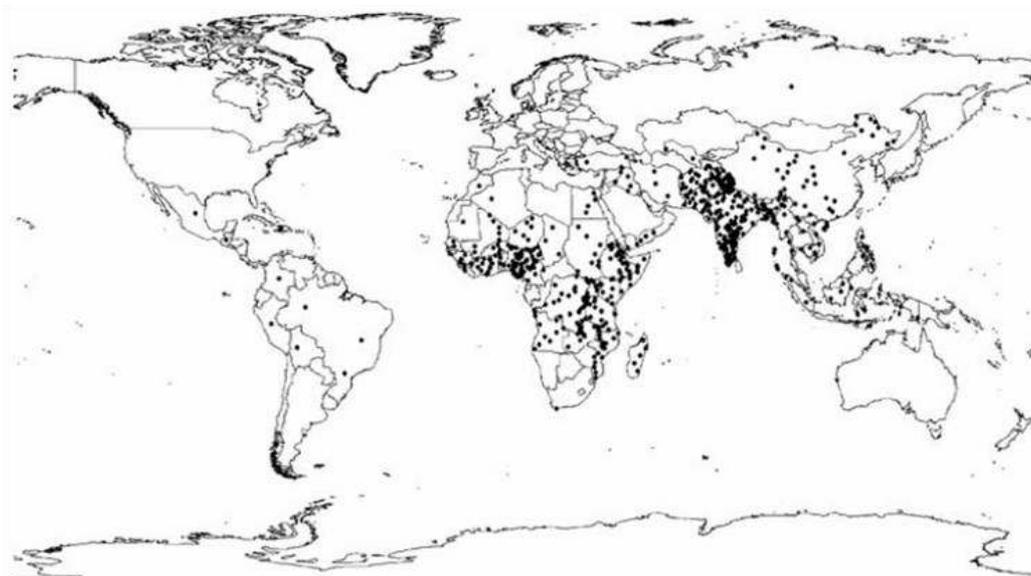


Figura 3. Estimación mundial de la distribución anual de muertes causadas por rotavirus con base en estudios publicados del 2000 al 2004. Cada punto representa 1,000 muertes (Parashar y col. 2006).

1.1.2 Gastroenteritis causada por rotavirus

Los rotavirus son la causa principal de gastroenteritis no solo en niños sino también en ciertas especies de mamíferos y aves jóvenes (Kojima y col. 1996). La gastroenteritis causada por rotavirus se caracteriza por diarrea acuosa usualmente precedida o acompañada por vómito y fiebre. Es una enfermedad auto-limitada de gravedad moderada a severa. El periodo de incubación es de 1-3 días seguido de 4-8 días de diarrea. La infección por rotavirus puede ser fatal como resultado de la deshidratación severa, la pérdida de electrolitos y la acidosis (Kombo y col. 2001; Food and Drug Administration 2006, Rotavirus Vaccine Program 2006).

Prácticamente, cada niño en el mundo ha sufrido al menos una infección por rotavirus antes de cumplir los cinco años. El pico de incidencia de la enfermedad se presenta en niños de entre 6 y 36 meses, quienes también tienen el mayor riesgo de la enfermedad más severa. Se cree que los anticuerpos maternos protegen a los niños más pequeños y los niños mayores han creado inmunidad por infecciones anteriores. Los niños que viven en países en vías de desarrollo tienen un mayor riesgo de presentar la enfermedad más severa (Figura 3) debido a factores como el incremento de la desnutrición y el limitado acceso a terapia avanzada para reemplazar fluidos perdidos por la diarrea y el vómito.

Las infecciones en adultos son usualmente subclínicas, pero ocasionalmente causan enfermedad en pacientes inmunocomprometidos (incluyendo aquellos con VIH), padres de niños con la enfermedad, ancianos y viajeros en países en desarrollo (Midthun y col. 1996; Parashar y col. 1998; Rotavirus Vaccine Program 2006).

En climas templados la diarrea ocurre predominantemente durante el otoño y el invierno, en climas tropicales y países en desarrollo la temporalidad es menos marcada (Midthun y col. 1996; Parashar y col. 1998).

Los rotavirus son excretados en las heces y se transmiten principalmente por la ruta fecal-oral. También se ha especulado la distribución a través de secreciones respiratorias, contacto persona-persona o superficies contaminadas (Midthun y col. 1996; Parashar y col. 1998). Se presume que la dosis infectiva es de 10-100 partículas virales infecciosas. Debido a que una persona con diarrea causada por rotavirus a menudo excreta un gran número de virus (100-1000 partículas infecciosas/mL de heces), la dosis de infección puede ser fácilmente adquirida a través de manos, objetos o utensilios contaminados. Además, la excreción asintomática del rotavirus es frecuente, por lo que aumenta el riesgo de adquirir la infección (Food and Drug Administration 2006).

Después de la ingestión, las partículas de rotavirus pasan al intestino delgado donde infectan a los enterocitos maduros ya sea por entrada directa o por endocitosis dependiente de calcio. Después de la replicación citolítica en los enterocitos maduros del intestino delgado, las nuevas partículas de rotavirus pueden infectar porciones distales del intestino delgado o ser excretadas en las heces (Anderson y col. 2004).

El mecanismo por el cual el rotavirus induce diarrea es poco conocido y es probable que involucre numerosos procesos. Los mecanismos potenciales por los que el rotavirus puede inducir diarrea son: reducción de la superficie absorptiva, daño funcional de la absorción, daño celular que afecta la absorción, efectos enterotoxigénicos de la proteína NSP4, estimulación del sistema nervioso entérico y permeabilidad epitelial alterada (Anderson y col. 2004).

Las medidas sanitarias adecuadas para eliminar bacterias y parásitos parecen no ser efectivas en el control endémico de rotavirus debido a que se ha observado una incidencia de infección por rotavirus similar en todos los países sin importar si sus estándares de salud son altos o bajos (Food and Drug Administration 2006).

El diagnóstico de la enfermedad se realiza por identificación del virus en las heces del paciente. La prueba más utilizada para analizar los especímenes clínicos es el inmunoensayo enzimático. Los ensayos comerciales requieren al menos 10^4 - 10^7 viriones para generar un resultado positivo, tienen un índice de falsos positivos de 3-5% y la mayoría no detectan rotavirus diferentes al grupo A. La detección se realiza en algunos laboratorios por microscopía electrónica y por electroforesis en gel de poliacrilamida debido a su patrón característico. La transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa se ha desarrollado para detectar e identificar a los tres grupos de rotavirus que afectan humanos (Anderson y col. 2004; Food and Drug Administration 2006).

El único tratamiento consiste en prevenir la deshidratación administrando fluidos y sales hasta que la enfermedad termine. En los casos más serios en los que el vómito frecuente provoca que la rehidratación oral no sea efectiva, los niños pueden requerir la aplicación de fluidos intravenosos (Rotavirus Vaccine Program 2006).

Existen dos vacunas orales contra rotavirus que han obtenido licencia en varios países, pero el efecto real de prevención de cada una de estas vacunas así como la ausencia de efectos secundarios asociados con su administración, podrá ser determinado en 2-3 años (Glass y col. 2006).

1.1.3 Estructura de los rotavirus

En 1973, Bishop y col. observaron por microscopía electrónica, en el epitelio duodenal de niños con diarrea severa de origen no bacteriano, un virus de 70 nm (Figura 4) al que posteriormente se llamó rotavirus (Latín, rota=rueda) por su apariencia (López y Arias 2006; Parashar y col. 1998).

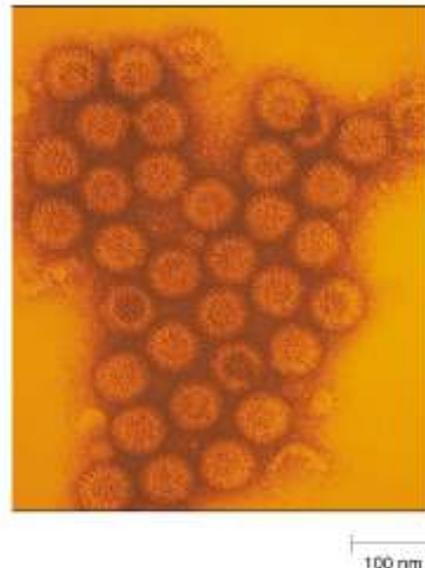


Figura 4. Microscopía electrónica de los rotavirus (Nester y col. 2001).

Los rotavirus son virus icosaédricos no envueltos de ácido ribonucleico de cadena doble (ARNcd) segmentado que pertenecen a la familia *Reoviridae*. La cápside viral está formada por tres capas que rodean al genoma viral. El genoma está formado por 11 segmentos de ARNcd que varían en tamaño de 3.3 kpb a 660 pb. Con excepción del segmento más pequeño que es dicistrónico, cada ARN codifica para una sola proteína ya sea estructural (VP) o no estructural (NSP) (Parashar y col. 1998; Cunliffe y col. 2002; Cook y col. 2004).

La capa más interna del virión, formada por 120 moléculas de proteína VP2, rodea al genoma viral y a 12 copias de cada una de las proteínas VP1 y VP3. La adición de 260 trímeros de VP6 sobre la capa de VP2 produce partículas de doble capa (DLPs). La capa más externa, característica de las partículas de triple capa (TLPs), está compuesta por dos proteínas, VP4 y VP7. La superficie externa lisa está formada por 780 copias de la glicoproteína VP7, organizada en trímeros; mientras que 60 estructuras en forma de espiga, formadas por dímeros de VP4 se extienden aproximadamente 12 nm sobre la superficie de VP7 (Figura 5).

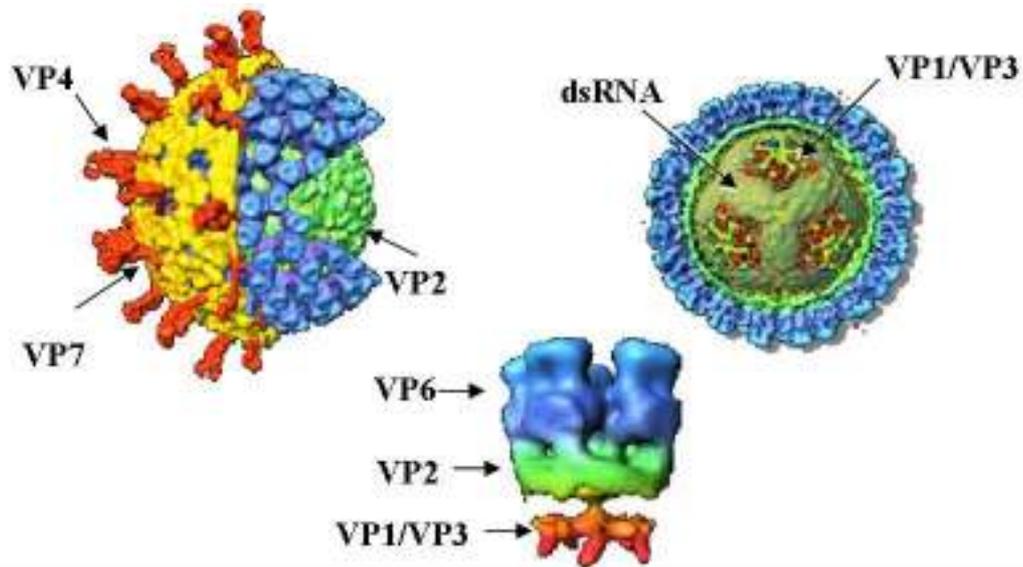


Figura 5. Estructura de los rotavirus (Estes 1996).

La partícula viral madura mide aproximadamente 100 nm de diámetro y contiene 132 canales porosos que permiten la entrada de compuestos en solución acuosa al interior de la cápside y la salida de los ARNm sintetizados (Arias y col. 2004). Además de estas proteínas estructurales, se pueden encontrar seis proteínas no-estructurales en células infectadas (Torres-Vega y col. 2000).

Las proteínas no estructurales de rotavirus se sintetizan en el citoplasma de la célula durante la infección y tienen funciones relacionadas con el control de la síntesis de proteínas celulares y virales, con la replicación del genoma viral, con el empaquetamiento de los genes virales y con la maduración de la partícula viral en el interior de la célula, aunque aún no se define completamente el papel de cada una de ellas en estas funciones (López y Arias 2006).

El conocimiento que se tiene acerca de la función de cada una de las proteínas estructurales y no estructurales de los rotavirus se resume en la Tabla 1 y Tabla 2, respectivamente.

Tabla 1. Características de las proteínas estructurales (VP's).

Proteína	Características
VP1	Es la ARN polimerasa viral dependiente de ARN, presenta actividades transcriptasa y replicasa debido a que cataliza la síntesis de ARNm viral y ARNcd genómico, respectivamente. Involucrada en el empaquetamiento del ARN (Varani y col. 2002; Vende y col. 2002; Berois y col. 2003).
VP2	Presenta afinidad por ARNcd, sin embargo, tiene mayor afinidad por ácido ribonucléico de cadena sencilla (ARNcs). El extremo N-terminal de VP2 es esencial para la incorporación de VP1 y VP3 en el centro del virión y corresponde al dominio de unión a ácidos nucleicos. Involucrada en la síntesis o empaquetamiento del ARN (Vende y col. 2002; Berois y col. 2003).
VP3	Es la enzima que adiciona el cap de los ARNm virales. Presenta afinidad por ARNcs. Involucrada en la síntesis o empaquetamiento del ARN (Vende y col. 2002).
VP4	<p>Forma prolongaciones en la superficie del virión. Es un determinante de la virulencia viral, de la naturaleza del huésped, de la inmunidad protectora y es requerida para la permeabilidad de membrana inducida por rotavirus y la entrada viral en las células.</p> <p>El corte con tripsina de VP4 es indispensable para la entrada del virus a la célula y produce 2 fragmentos:</p> <p><u>VP5*</u>: Polipéptido C-terminal (residuos 248-776), interacciona con las membranas y activa al virus para la entrada celular.</p> <p><u>VP8*</u>: Fragmento N-terminal, se une al ácido siálico en las superficies de las células y es la hemaglutinina viral (Golantsova y col. 2004).</p>
VP6	Es la proteína viral más abundante, el determinante principal de la reactividad del grupo, blanco de ensayos de diagnóstico comunes y contiene el antígeno usado para la clasificación adicional de rotavirus en los subgrupos I y II (Parashar y col. 1998).
VP7	Glicoproteína predominante en la superficie de la cápside externa, reconocida por anticuerpos neutralizantes y determinante del serotipo G de los rotavirus (Golantsova y col. 2004).

Tabla 2. Características de las proteínas no estructurales (NSP's).

Proteína	Características
NSP1	Se sugiere que NSP1 en células infectadas por rotavirus inhibe la activación de IRF-3 con lo que se disminuye la respuesta celular por interferón (Graff y col. 2002).
NSP2	Induce la hiperfosforilación de NSP5. Fuerte afinidad por ARNcs independiente de la secuencia, interacciona con la ARN polimerasa viral, se autoensambla en octámeros que presentan actividad NTPasa dependiente de Mg^{+2} y actividad desestabilizante de hélices independiente de Mg^{+2} , lo que sugiere que está involucrada en el empaquetamiento del ARN viral (Vende y col. 2002; Berois y col. 2003).
NSP3	Promueve la traducción del ARNm viral con mayor eficiencia que el de la célula huésped. Posible blanco para el diseño de nuevos antivirales (Graff y col. 2002; Padilla-Noriega y col. 2002; Varani y col. 2002; Vende y col. 2002).
NSP4	La forma glicosilada de NSP4 se ha relacionado al proceso de brote del virión, uniendo las partículas de doble capa al retículo endoplásmico debido a su interacción con VP6. Un fragmento de NSP4 se ha relacionado a la patogénesis viral actuando como una enterotoxina que induce diarrea en ratones (Chnaiderman y col. 2002; Graff y col. 2002; Iturriza-Gomara y col. 2003).
NSP5	La co-expresión de NSP2 y NSP5 en células no infectadas genera estructuras similares a viroplasma y regula positivamente la hiperfosforilación de NSP5. Presenta actividad autocinasa. Posee afinidad similar al ARNcs como al ARNcd independiente de la secuencia. Se sugiere que NSP5 es un adaptador entre NSP2 y el complejo de replicación VP2-VP1-VP3 modulando la función de NSP2 como motor molecular en el empaquetamiento del ARNm viral. Interacciona con NSP6 (Vende y col. 2002; Berois y col. 2003).
NSP6	Interacciona con NSP5 (Vende y col. 2002).

1.1.4 Clasificación de los rotavirus

Los rotavirus poseen 3 especificidades antigénicas importantes de acuerdo al sistema unificado de clasificación serotípica propuesto para las cepas de rotavirus por Hoshino y col. en 1984:

- 1) Grupo, determinado principalmente por VP6: De los 7 grupos de rotavirus descritos (A-G), sólo los grupos A, B y C infectan humanos, siendo el grupo A la causa principal de gastroenteritis severa en niños y el objetivo principal para el desarrollo de vacunas. El grupo B se ha asociado con brotes de diarrea severa que afectan a miles de personas de todas las edades en China. El grupo C ha sido asociado con casos raros y esporádicos de diarrea en niños en muchos países (los primeros brotes fueron reportados en Japón e Inglaterra).
- 2) Subgrupo, determinado por antígenos de la proteína VP6: La mayoría de las cepas pertenecen al subgrupo I ó II, aunque algunas presentan ambas especificidades y unas pocas no pertenecen a ningún subgrupo.
- 3) Serotipo, definido por las proteínas de la cápside externa VP7 (designada como G debido a que es una glicoproteína) y VP4 (designada como P por su sensibilidad a proteasa): Ambas proteínas forman las bases de la clasificación binaria y son consideradas críticas en el desarrollo de vacunas porque inducen anticuerpos neutralizantes de manera independiente y están involucradas en inmunidad protectora (Midthun y col. 1996; Parashar y col. 1998; Dennehy y col. 2005; Santos y col. 2005; Food and Drug Administration 2006).

En humanos, las cepas P[8]G1, P[4]G2, P[8]G3 y P[8]G4 son responsables del 88.5% de la diarrea causada por rotavirus a nivel mundial (Figura 6). Sin embargo, las cepas predominantes dependen de la región. (Dennehy y col. 2005; Santos y col. 2005)

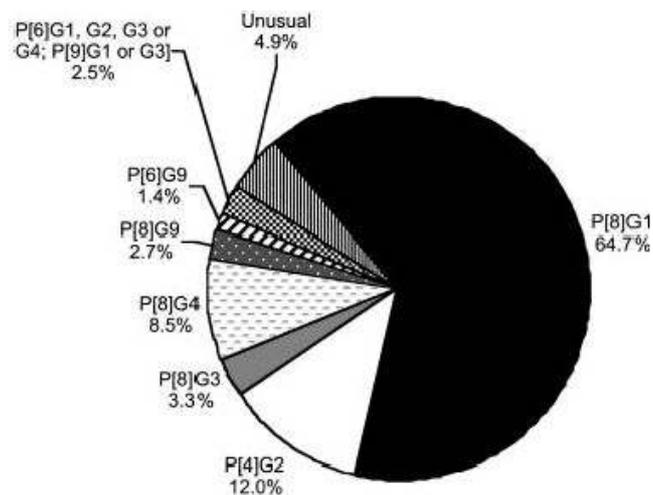


Figura 6. Distribución mundial de los tipos G y P del grupo A de los rotavirus reportados entre 1989 – 2004 (Santos y col. 2005).

Entre los años 1993-94 se reportó la emergencia de serotipos raros G5, G6, G8, G10 y sobre todo G9 (Figura 7). Para el año 2005, se reportó al serotipo G9 asociado a P[8] o P[6] como el cuarto tipo G de mayor importancia a nivel mundial con una frecuencia de 4.1% (Figura 6) (Dennehy y col. 2005; Santos y col. 2005).

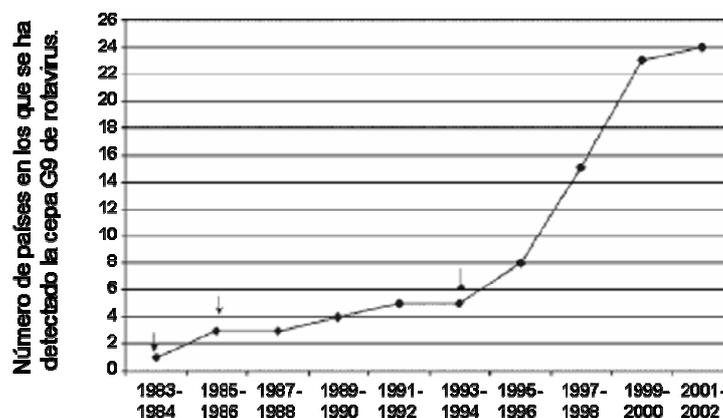


Figura 7. Distribución temporal del serotipo G9 de rotavirus en el mundo desde 1983. Los países incluidos son: USA, Japón, India, Tailandia, Italia, Bangladesh, UK, Argentina, Brasil, Australia, España, Francia, Malawi, Irlanda, Holanda, Paraguay, Ghana, China, Hungría, Libia, Kenia, Cuba, Albania y México. Las flechas indican la emergencia de linajes de la cepa (Santos y col. 2005).

En cepas de rotavirus que infectan humanos, se han identificado cuatro mecanismos que contribuyen a su diversidad:

- 1) Mutaciones puntuales: Se presentan eventos únicos o su acumulación a lo largo del tiempo debido a que las ARN replicasas (polimerasas de ARN dependientes de ARN), a diferencia de las ADN polimerasas, no presentan actividad de corrección de la replicación lo que produce frecuencias altas de mutación (aproximadamente una por cada replicación del genoma). Algunas se conservan y se transmiten a la progenie. Pueden usarse para definir linajes y sublinajes (Gouvea y col. 1995; Iturriza-Gómara y col. 2001).
- 2) Intercambio de segmentos genómicos: El genoma segmentado se reacomoda con facilidad durante una co-infección de dos virus a una sola célula lo que produce una progenie híbrida. Esta propiedad se ha usado en el desarrollo de vacunas y es importante en la evolución del virus (Gouvea y col. 1995; Parashar y col. 1998; Iturriza-Gómara y col. 2001).
- 3) Recombinación intramolecular: Ocurre tanto *in vivo* como *in vitro*. La mayoría de los re-arreglos involucran duplicación parcial del marco abierto de lectura (ORF) normal. Los mecanismos que generan los re-arreglos no han sido bien elucidados (Kojima y col. 1996; Iturriza-Gómara y col. 2001).
- 4) Introducción de rotavirus que infectan animales en la población humana: Puede ocurrir la transmisión del virus completo o de algunos genes a una cepa base que infecta humanos (Iturriza-Gómara y col. 2001).

1.1.5 Ciclo replicativo de los rotavirus

En células epiteliales infectadas por el virus, la replicación parece llevarse a cabo en los viroplasmos, estructuras electrodensas encontradas en el citoplasma 2-3 h después de la infección formadas por proteínas estructurales (VP1, VP2, VP3, VP6), no estructurales (NSP2, NSP5, NSP6) y ARN viral (Afrikanova y col. 1998; Torres-Vega y col. 2000). En la Figura 8 se muestra el ciclo de replicación viral.

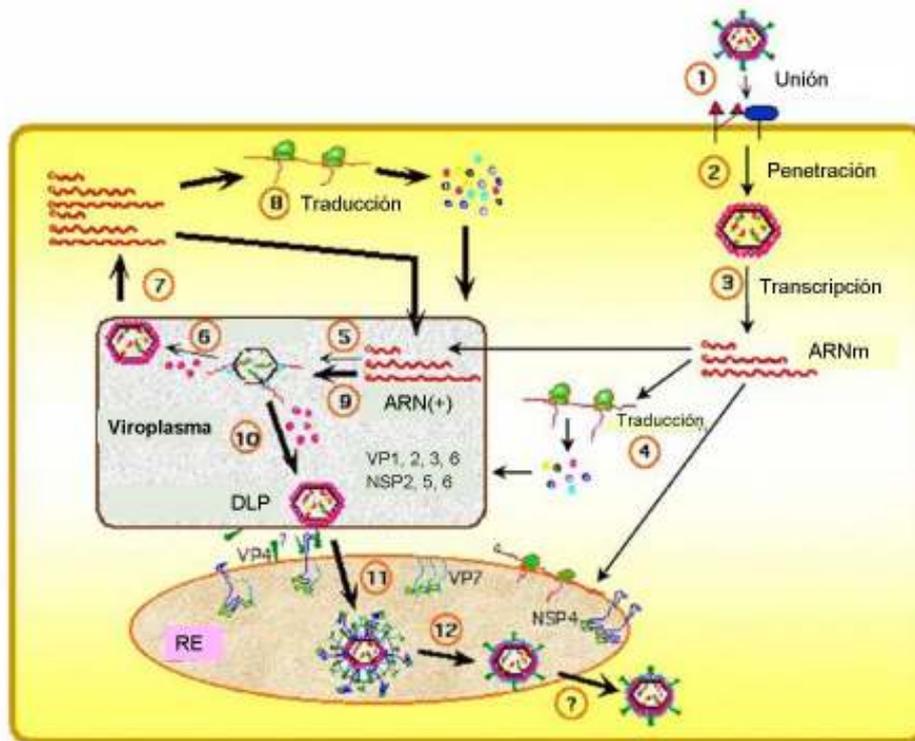


Figura 8. Ciclo de replicación de los rotavirus (adaptado de Arias y col. 2004).

El ciclo es altamente lítico, se completa en 12 h y consta de varios pasos.

- 1) Unión del virión a la superficie de la célula,
- 2) Penetración y pérdida de la cubierta de la partícula viral para producir DLPs: La TLP pierde las dos proteínas de su capa más externa durante o poco después de su entrada a la célula y produce una DLP que es transcripcionalmente activa.
- 3) Transcripción primaria del ARNcd genómico: VP1 sintetiza los transcritos virales primarios, los cuales son extruidos en el citoplasma de la célula a través de canales que atraviesan la partícula icosaédrica.
- 4) Síntesis de proteínas virales: Los transcritos de ARN dirigen la síntesis de las proteínas virales (funcionan como ARNm) y también sirven como ARN molde (ARN(+)) para la síntesis de cadenas negativas de ARN (ARN(-)) para formar segmentos de ARNcd del genoma.
- 5) Ensamblaje de núcleos de intermediarios de la replicación (RIs) y síntesis de ARN(-): Una vez que se ha acumulado una masa crítica de proteínas

virales en los viroplasmos, se ensamblan partículas de núcleos de RIs en un proceso altamente coordinado para que el empaquetamiento y la replicación produzcan núcleos que contengan una copia de cada uno de los 11 segmentos de ARNcd.

- 6) Ensamblaje de DLPs.
- 7) Transcripción secundaria de DLPs: Se produce una segunda ronda de transcripción potenciada.
- 8) Síntesis secundaria potenciada de proteínas virales.
- 9) Ensamblaje secundario, incrementado el número de núcleos de RIs y síntesis de ARN (-).
- 10) Ensamblaje secundario incrementado el número de DLPs.
- 11) Paso de DLPs a través de la membrana del retículo endoplásmico (ER) y adquisición de envoltura membranal: Las partículas adquieren una envoltura membranal transitoria que contiene además de NSP4, las proteínas VP4 y VP7 así como cantidades menores de otras NSP.
- 12) Pérdida de la envoltura membranal y generación de TLPs: La envoltura lipídica es removida por un mecanismo desconocido que produce TLPs maduras (Arias y col. 2004).

1.1.6 Vacunas contra rotavirus

Se cree que una vacuna sería la forma más efectiva y económica de detener al rotavirus tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo por varios motivos: 1) las infecciones por rotavirus adquiridas naturalmente proveen protección contra la severidad de la enfermedad producida por infecciones posteriores; 2) la transmisión de rotavirus no se ve afectada con las mejoras de higiene y sanidad, uno de los principales enfoques para controlar otros tipos de enfermedad diarreica; 3) el tratamiento intravenoso necesario para re-hidratar pacientes con diarrea severa por rotavirus no está disponible para muchos niños en los países en desarrollo (Rotavirus Vaccine Program 2006).

Todas las vacunas contra rotavirus (Tabla 2) en las últimas etapas de desarrollo son cepas atenuadas de rotavirus administradas oralmente en dosis múltiples (Cunliffe y col. 2002).

Tabla 3. Características de candidatos y vacunas contra rotavirus
(adaptada de Santos y col. 2005).

Vacuna	Serotipos	Características	Status	Compañía
<i>Enfoque Jenneriano</i>				
LLR	G10 P[12]	Vacuna monovalente Rotavirus de oveja	Licencia en China, 2000	Lanzhou Institute of Biological Products (China)
<i>Enfoque Jenneriano modificado</i>				
RotaShield	G1, 2, 3, 4 P[3]	Vacuna tetravalente 3 cepas humanas y 1 de mono	Licencia en USA, 1998 Retirada, 1999	Wyeth Ayerst (USA)
RotaTeq	G1, 2, 3, 4 P[5]	Vacuna pentavalente Rotavirus humano- bovino	Aprobada por la FDA, 2006	Merck (USA)
<i>Enfoque no Jenneriano</i>				
Rotarix	G1, P[8]	Vacuna monovalente Rotavirus humano atenuado	Licencia en México, 2004 Aprobado en Europa, 2006	GlaxoSmithKline (Bélgica)
RV3	G3 [P6]	Vacuna monovalente Cepa neonatal humana	Fase II	DynCorp (USA)
<i>Enfoque de partículas similares a virus</i>				
VLPs	VP2/6	Partícula similar a virus de simio (SA11)	En desarrollo	Lederle/Green Cross (Korea)

La atenuación de los rotavirus para su uso como vacunas orales puede lograrse de varias formas:

- 1) Enfoque Jenneriano: involucra la inmunización con cepas de rotavirus de huéspedes animales consideradas naturalmente atenuadas para humanos, el uso de este enfoque en la vacunación produjo eficacia variable en pruebas de campo debido a que confiere inmunidad principalmente homotípica (Cunliffe y col. 2002).
- 2) Enfoque Jenneriano modificado: utiliza la habilidad de los rotavirus para intercambiar segmentos de ARN durante infecciones mezcladas *in vitro*. Usando este enfoque se pueden producir mezclas de rotavirus con varios serotipos de huéspedes humanos en cepas de huéspedes animales (Cunliffe y col. 2002; Dennehy y col. 2005).
- 3) Enfoque no Jenneriano: utiliza sólo cepas atenuadas de rotavirus de origen humano (incluyen cepas de rotavirus recuperadas de recién nacidos asintomáticos que pueden ser menos virulentas) para evitar posibles reacciones indeseadas asociadas al uso de cepas de huéspedes animales (Santos y col. 2005).

Otros candidatos para la producción de vacunas a largo plazo incluyen:

- 1) Enfoque de partículas similares a virus: recurre al uso de estructuras multiproteínicas que imitan la conformación de partículas nativas auténticas pero que carecen del genoma viral, dichas partículas pueden diseñarse para contener distintos serotipos de rotavirus lo que puede conferir una mayor protección. Sólo han sido probadas en modelos animales (Cunliffe y col. 2002; Vieira y col. 2005).
- 2) Vacunas de ADN (Cunliffe y col. 2002).

1.1.6.1 Descripción de algunas vacunas contra rotavirus

RotaShield (Wyeth Laboratories, Marietta, PA): Fue la primera vacuna aplicada contra rotavirus. En agosto de 1998, obtuvo licencia en los Estados Unidos y fue

recomendada para la inmunización de rutina de los niños de ese país. Sin embargo, 9 meses después, se suspendió su uso debido a que se reportó una posible asociación con la intususcepción o invaginación intestinal (1 caso por cada 12,000 vacunados). Al confirmarse esta asociación, el fabricante detuvo su producción y el Comité Asesor de Prácticas de Inmunización retiró la recomendación para su uso (Parashar y col. 2003). La asociación propuesta entre la vacunación contra rotavirus y la intususcepción con la subsecuente retirada de la vacuna RotaShield, estimuló un intenso debate acerca de la relación riesgo-beneficio de las vacunas contra rotavirus especialmente con su uso en países en desarrollo. Todas las vacunas futuras contra rotavirus necesitan demostrar su seguridad con respecto a la invaginación intestinal, lo que requiere una mayor cantidad de pruebas de la vacuna (Cunliffe y col. 2002).

Rotarix (GlaxoSmithKline): Es una vacuna producida a partir de una cepa atenuada de huéspedes humanos representativa de los serotipos actuales más comunes en humanos (P[8], G1). Esta vacuna obtuvo licencia en México y República Dominicana en el 2004 y posteriormente en más de 35 países además de la Unión Europea (Glass y col. 2006).

RotaTeq (Merck): Es una vacuna pentavalente de rotavirus reordenados de cepas bovino-humano. Está formada por cinco cepas reordenadas de rotavirus, cada una contiene diez genes de la cepa bovina parental y un gen que codifica para una proteína de la cápside para los serotipos humanos G1, G2, G3, G4 y P[8]. Esta vacuna obtuvo licencia por la Food and Drug Administration en Febrero del 2006 y fue recomendada dos semanas después para la inmunización de rutina de los niños en Estados Unidos (Glass y col. 2006).

Para desarrollar estrategias de vacunación y terapéuticas efectivas es fundamental un entendimiento básico de los mecanismos moleculares por los cuales los rotavirus interaccionan con la célula hospedera (Arias y col. 2004).

1.1.7 Proteínas NSP5 y NSP6

El gen 11 de rotavirus (GenBank: X69486) codifica para las proteínas NSP5 y NSP6 en marcos abiertos de lectura (ORFs) alternativos (Figura 9).

```

GGCTTTTAAAGCGCTACAGTGATGTCTCTCAGCATTGACGTAACGAGTCTTCCCT
CAATTTCTTCTAGTATCTTTAAAAATGAATCGTCTTCTACAACGTCAACTCTTTCTG
GAAAATCTATTGGTAGGAGTGAACAGTACATTTACCAGATGCAGAAGCATTCAA
TAAATACATGTTGTCGAAGTCTCCAGAGGATATTGGACCATCTGATTCTGCTTCAA
ACGATCCACTCACCAGTTTTTCGATTAGATCGAATGCAGTTAAGACAAATGCAGA
CGCTGGCGTGTCTATGGATTCATCGACGCAATCACGACCTTCAAGTAACGTTGGG
TGCGATCAAGTGGATTCTCCTGACTAAAGGTATTAATGTTAGTGCCAATCTTGA
CTCATGTATATCAATTTCAACTGATCATAAGAAGGAGAAATCCAAAAAAGATAAAA
GTAGGAAACACTACCCAAGAATTGAAGCAGATTCTGATTCTGAAGATTATGTTTTA
GATGATTCAGATAGTGATGACGGTAAATGTAAGAATTGTAATATAAGAAAAAGTA
TTTCGCACTAAGAATGAGGATGAAGCAAGTCGCAATGCAATTGATCGAAGATTTG
TAAATGTCAACCTGAGAGCACACTAGGGAGCTCCCCACTCCCGTTTTGTGACC

```

Figura 9. Secuencia de nucleótidos del segmento 11 completo. La región codificante para la proteína NSP5 se muestra delimitada por la línea externa. La línea interna contiene a la región codificante para la proteína NSP6.

El primer ORF inicia en el nucleótido 22 y codifica para NSP5, una fosfoproteína O-glicosilada de 197 aminoácidos, rica en serina y treonina (25%). El segundo ORF inicia en el nucleótido 80, fuera de fase (+1) con respecto al primero y codifica para una proteína de 92 aminoácidos (NSP6) que se sintetiza en células infectadas por rotavirus. (López y col. 1993; Torres-Vega y col. 2000).

1.1.7.1 NSP5

Se ha reportado que NSP5 y NSP2 interactúan para formar estructuras similares a viroplasmos en ausencia de otras proteínas virales y de replicación viral (Fabbretti y col. 1999). También se ha sugerido que en ausencia de NSP2, NSP5 es capaz de formar estructuras similares a viroplasmos cuando su extremo N-terminal se encuentra inaccesible para su interacción (Mohan y col. 2003). Aunque

el grado de fosforilación NSP5 se ve afectado por fosfatasa celulares, esta proteína presenta actividad autocinasa que puede ser regulada por multimerización; sin embargo, no existe homología entre NSP5 y la mayoría de las proteínas cinasas (Torres-Vega y col. 2000; Chnaiderman y col. 2002).

NSP5 es capaz de formar homo-oligómeros. Los 10 aminoácidos del extremo C-terminal (188-197), mostrado en la Figura 10, son esenciales para la multimerización de la proteína. La multimerización de NSP5 es crítica para la generación eficiente de especies hiperfosforiladas de la proteína (Torres-Vega y col. 2000).

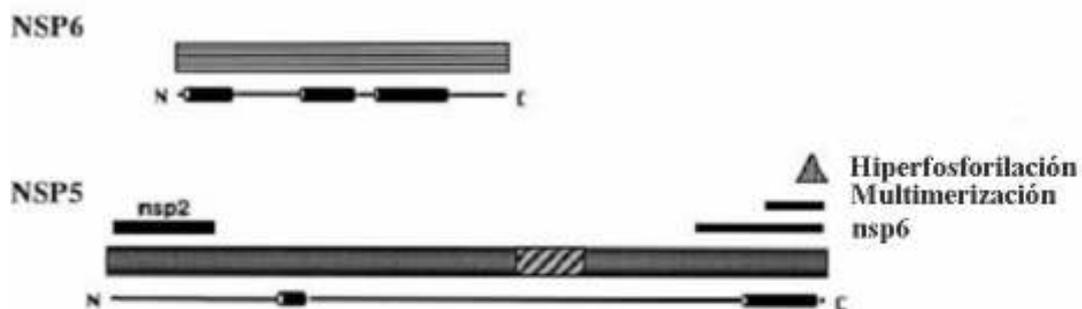


Figura 10. Dominios estructurales y funcionales de las proteínas NSP5 y NSP6 de rotavirus (adaptado de Torres-Vega y col. 2000).

La fosforilación de NSP5 es un proceso complejo que inicia con la transformación del precursor de 26 kDa en la forma de 28 kDa, a partir del cual, en células infectadas es hiperfosforilada produciendo isoformas de 32-34 kDa. Los fosfatos se unen a NSP5 vía residuos de serina y treonina, tanto en la fosforilación *in vivo* como *in vitro*. La hiperfosforilación de NSP5 es activada *in vivo* por NSP2 (Afrikanova y col. 1998).

La fosforilación de NSP5 regula el equilibrio traducción/replicación realizado por el ARNm. A menor grado de fosforilación, menor replicación de ARN y mayor disponibilidad de ARNm para la traducción; la regulación positiva de la

fosforilación de NSP5 por la interacción con NSP2 dirigirá al ARN al viroplasma para su replicación (Chnaiderman y col. 2002).

NSP5 interacciona con VP2 en células epiteliales infectadas MA104 (línea de células fetales de riñón de mono *rhesus*). Se sugiere que NSP5 es un adaptador entre NSP2 y el complejo de replicación VP2-VP1-VP3. Al unirse a los núcleos de células infectadas, NSP5 podría bloquear o permitir el ensamblaje de la cápside externa haciendo posible para estas partículas continuar con la actividad replicasa. NSP5 interacciona con VP2 y VP6 impide esta interacción. La competencia entre VP6 y NSP5 por VP2 podría liberar el complejo NSP2-NSP5 de los núcleos del intermediario de la replicación, probablemente en las orillas del viroplasma en las cuales VP6 se acumula (Berois y col. 2003).

Se ha descrito que NSP5 presenta un sitio aparente de unión a ATP en su extremo N-terminal (Torres-Vega 2000) y que al removerse este sitio no se modifica la capacidad de fosforilación de la proteína (Fabbretti y col. 1999).

1.1.7.2 NSP6

La región de NSP5 involucrada en la interacción con NSP6 se localiza entre los aminoácidos 163-197. Debido a que los dominios de NSP5 responsables de la homo-multimerización y de la interacción con NSP6 se traslapan parcialmente, se sugiere que NSP6 podría tener un papel regulatorio en la multimerización de NSP5 y por lo tanto en la actividad de hiperfosforilación. El papel regulatorio de NSP6 es apoyado por su baja síntesis en células infectadas por rotavirus (Torres-Vega y col. 2000).

1.2 PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

1.2.1 *Escherichia coli*

La bacteria entérica *Escherichia coli* (Figura 11) es uno de los organismos procariotes más usados para manipulaciones genéticas y para la producción industrial de proteínas de interés terapéutico o comercial. Comparado con otros sistemas de expresión, *E. coli* ofrece ventajas como facilidad de manejo, disponibilidad de vectores, crecimiento en fuentes de carbono económicas, acumulación rápida de biomasa, escalamiento sencillo y fermentaciones de alta densidad celular. Es común que *E. coli* produzca las proteínas recombinantes en niveles del 10 al 30% de la proteína total. Además, debido a su larga historia como sistema modelo, la genética de *E. coli* está totalmente caracterizada y su cromosoma se ha manipulado para facilitar la clonación y la expresión génica (Goulding y Perry 2003; Baneyx y col. 2004).



Figura 11. *Escherichia coli*

(http://recursos.cnice.mec.es/biosfera/alumno/1ESO/planeta_habitado/imagenes/jj_e_coli.jpg, 2006).

Si las proteínas heterólogas no requieren modificaciones pos-traduccionales complejas y son expresadas en forma soluble, *E. coli* suele ser la primera opción

para obtener suficiente material para estudios bioquímicos y/o estructurales y para la subsecuente producción a gran escala de productos de valor agregado. Sin embargo, es común que las proteínas recombinantes sobre-expresadas no logren adquirir una conformación correcta y sufran degradación proteolítica o se asocien entre ellas para formar agregados insolubles de proteínas no nativas conocidas como cuerpos de inclusión (Baneyx y col. 2004).

1.2.2 Chaperonas moleculares

Los cuerpos de inclusión son agregados grandes principalmente de formas inactivas de la proteína sobre-expresada. Las grandes concentraciones de proteína y las temperaturas altas promueven la agregación no específica sobre el plegamiento nativo de las proteínas. En algunos casos, este problema puede disminuirse por la sobreproducción simultánea de chaperonas moleculares.

Las chaperonas son proteínas que se asocian con polipéptidos no plegados con lo que previenen la agregación (asociación no específica y desordenada de cadenas polipeptídicas lo que lleva a la formación de partículas de proteínas heterogéneas sin ninguna actividad biológica) y promueven el plegamiento de una manera dependiente de ATP. Las chaperonas son capaces de unirse a una gran variedad de polipéptidos que difieren considerablemente en secuencia de aminoácidos y conformación.

Las moléculas hidrofóbicas tienden a asociarse en un ambiente polar por razones de entropía y entalpía. Por esta razón, los aminoácidos hidrofóbicos se encuentran predominantemente en el centro de una proteína plegada. Cuando hay un plegamiento erróneo, los residuos hidrofóbicos de una proteína están parcialmente accesibles al solvente lo que los vuelve susceptibles de agregación. Las chaperonas se asocian a estas especies hidrofóbicas inhibiendo las interacciones indeseadas entre ellas permitiendo que la proteína se pliegue en su estructura nativa de manera más eficiente. Una vez que las proteínas se han plegado en una

conformación nativa ya no presentan las regiones hidrofóbicas y dejan de ser sustratos para las chaperonas moleculares (Walter y col. 2002).

1.2.2.1 Sistema GroE

Las proteínas GroE de la bacteria *E. coli* son las chaperonas más estudiadas. Los genes *groEL* y *groES* codifican para proteínas de 57 y 10 kDa respectivamente, ambas proteínas son indispensables para la viabilidad de *E. coli*. GroEL se ensambla formando una estructura de barril abierto en ambos extremos. Está formado por 14 subunidades que se ensamblan en 2 anillos de 7 miembros cada uno, los cuales forman 2 cavidades separadas. La co-chaperona GroES presenta una estructura de anillo en forma de domo que consiste de 7 subunidades (Walter y col. 2002). El plegamiento asistido por GroE puede dividirse en 3 etapas: captura, encapsulamiento/plegamiento y liberación (Figura 12).

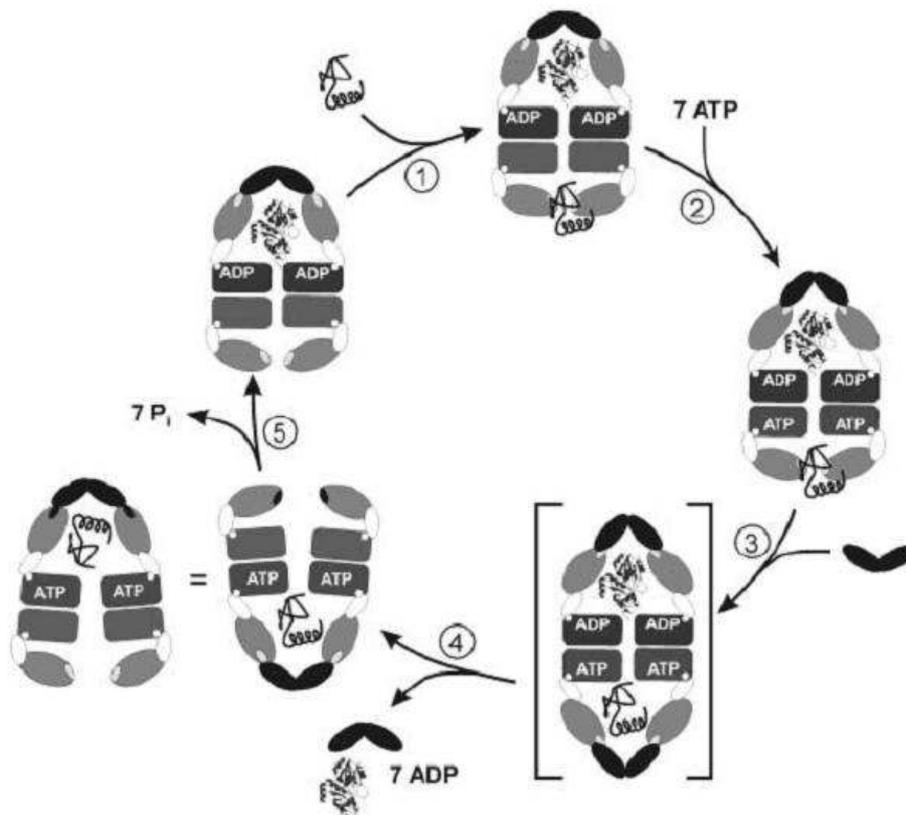


Figura 12. Ciclo de las chaperonas GroE (Walter 2002).

Aunque ambos anillos de GroEL están activos al mismo tiempo, se encuentran en diferentes fases del ciclo. El procesamiento de un polipéptido requiere dos recorridos del ciclo ilustrado, durante los cuales el polipéptido permanece asociado al mismo anillo GroEL. Por razones gráficas, la orientación de la molécula GroEL se invierte en el paso 4. Durante la captura (paso 1), un polipéptido hidrofóbico se une a GroEL. El anillo aceptor (anillo inferior) se encuentra libre de nucleótidos por lo que presenta gran afinidad por el polipéptido. La unión de ATP (paso 2) y GroES (paso 3) a este anillo induce una serie de cambios estructurales en GroEL. La afinidad por el polipéptido unido decrece por lo que se libera en la cavidad cerrada donde se comienza a plegar. La hidrólisis del ATP (paso 5) induce un segundo cambio conformacional en GroEL (anillo superior) que permite que el anillo inferior se una a un polipéptido e inicie un nuevo ciclo. Después de la unión del ATP y GroES en la siguiente ronda, GroES es desplazado del anillo superior y el polipéptido sustrato es liberado (paso 4). La formación del complejo simétrico mostrado entre corchetes es controversial (Walter 2002).

1.3 PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

El desarrollo de técnicas y métodos para la purificación de una proteína es un prerequisite esencial para muchas de las aplicaciones en biotecnología. Las claves para lograr una purificación eficiente de proteína residen en la selección de las técnicas más adecuadas y en la optimización del proceso, de manera que se maximice el rendimiento minimizando el número de pasos requeridos. La mayoría de los esquemas de purificación involucran alguna forma de cromatografía. Las proteínas recombinantes a menudo se producen en formas que facilitan su purificación cromatográfica posterior (Amersham Biosciences, edition AC, 2001).

La cromatografía se define clásicamente como el método de separación de los constituyentes de mezclas por migración diferencial durante su paso a través de una columna cromatográfica. La separación se rige por la distribución de sustancias entre dos fases: la fase móvil y la fase estacionaria. La fuerza de la interacción resultante entre las moléculas de soluto y las moléculas de cada fase se determina por las propiedades físicas y químicas de las moléculas del soluto en el ambiente dado (Krstulovic 1982).

Las biomoléculas se purifican utilizando técnicas que permiten su separación de acuerdo a las diferencias entre sus propiedades específicas, como son: bioreconocimiento o especificidad por el ligando (cromatografía por afinidad), carga (cromatografía por intercambio iónico), tamaño (filtración en gel o exclusión por tamaño) o hidrofobicidad (cromatografía por interacción hidrofóbica o cromatografía en fase reversa) (Amersham Biosciences, edition AD, 2002).

Al estandarizar un protocolo de purificación es necesario definir los requerimientos de pureza de acuerdo al uso final del producto, que puede ser: uso terapéutico y estudios *in vivo* (>99%), análisis de cristalografía por rayos X y métodos de caracterización físico-química (95-99%) o elaboración de antígenos para la producción de anticuerpos y secuenciación N-terminal (<95%) (Amersham Biosciences, edition AC, 2001).

1.3.1 Cromatografía por afinidad

Es una técnica que separa las proteínas con base en la interacción reversible entre una proteína (o grupo de proteínas) con un ligando específico unido a una matriz cromatográfica (Figura 13). Permite la purificación de una biomolécula con base en su función biológica o estructura química individual. Puede utilizarse para separar las moléculas activas de las desnaturalizadas o formas funcionalmente distintas, para aislar sustancias puras presentes a baja concentración en grandes volúmenes de muestra cruda y también para remover contaminantes específicos. La proteína de interés se recupera con un alto grado de pureza y actividad.

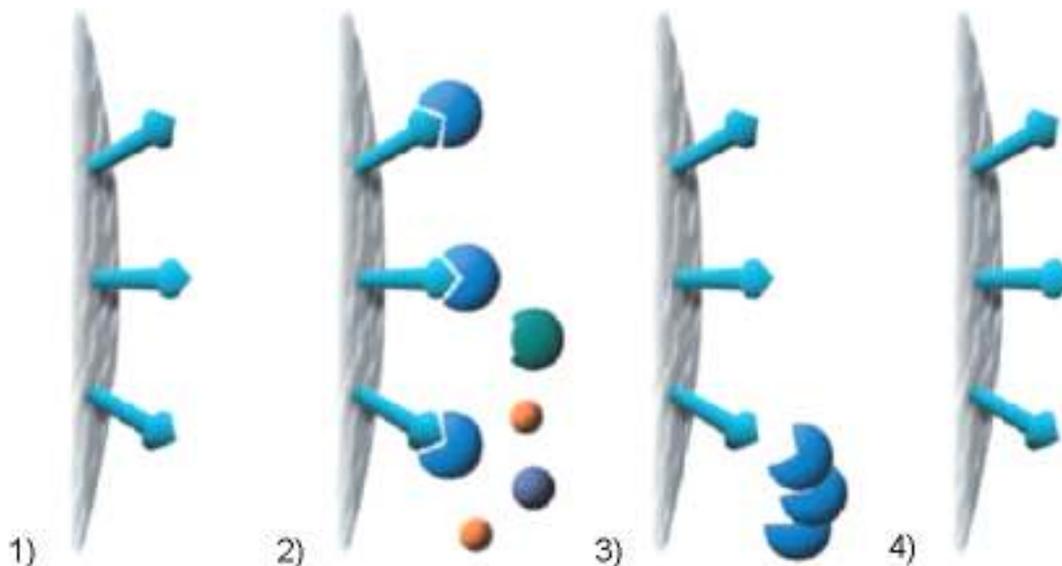


Figura 13. Principio de la separación por cromatografía de afinidad. **1)** El medio de afinidad se equilibra en buffer de unión. **2)** La muestra se aplica en condiciones que favorecen la unión específica de moléculas blanco a una sustancia complementaria para la unión (ligando), el material no unido se lava a través de la columna. **3)** La proteína blanco se recupera cambiando las condiciones para favorecer la remoción de la moléculas unidas usando un ligando competitivo o cambiando el pH, la fuerza iónica o la polaridad. **4)** El medio de afinidad se re-equilibra en buffer de unión (Amersham Biosciences, edition AD, 2002).

La amplificación de una proteína fusionada a una cola (péptido o proteína) de tamaño y función biológica conocidos puede simplificar enormemente el aislamiento, purificación y detección de la misma. En algunos casos, el rendimiento de proteína también puede ser incrementado. Las dos colas más comúnmente usadas son la glutathione S-transferase (GST) y seis residuos de histidina (His)₆ (Amersham Biosciences, edition AB, 2001).

1.4 CRISTALIZACIÓN

Las proteínas, como muchas otras moléculas, pueden ser inducidas a formar cristales cuando se colocan en las condiciones adecuadas. Para cristalizar una proteína, la proteína purificada deberá experimentar una precipitación lenta en una solución acuosa. Como resultado, las moléculas individuales de proteína se alinean en series repetitivas adoptando una orientación consistente. La organización cristalina que se forma se mantiene unida por medio de interacciones no covalentes. La importancia de la cristalización radica en que sirve de base para la cristalografía por rayos X, técnica en la que una proteína cristalizada es utilizada para determinar su estructura tridimensional vía difracción por rayos X. La cristalización de proteínas tiene dificultades inherentes debido a la frágil naturaleza de los cristales de proteína. Adicionalmente, la producción de cristales útiles para el análisis por rayos X depende de factores ambientales debido a la variación que existe entre las proteínas, por lo que cada proteína requiere condiciones individuales para su cristalización exitosa. Algunos factores que requieren ser considerados son la pureza y concentración de la proteína, el pH, la temperatura y los precipitantes (Davidson College 2003).

Existen varias técnicas para estandarizar las condiciones de cristalización de una proteína dentro de las que se incluyen la difusión en vapor (sitting-drop) y la difusión líquido-líquido o de interfase libre (McPherson 1999).

1.4.1 Difusión en vapor (sitting-drop)

El método de difusión en vapor es el enfoque más ampliamente utilizado. Es ideal para el análisis de un amplio espectro de condiciones de cristalización y puede ser escalado para obtener grandes cristales apropiados para el análisis de difracción por rayos X. Hay dos procedimientos comunes para realizar cristalización por difusión de vapor, y se basan ya sea en una gota sostenida sobre alguna superficie en cuyo caso es llamado sitting-drop o en un arreglo en el que la gota está suspendida de alguna superficie que es llamado hanging-drop (McPherson 1999).

Una gota compuesta por una mezcla de muestra y reactivo se coloca en equilibrio de vapor con un reservorio líquido de reactivo. La gota contiene una concentración menor de reactivo que el del reservorio (Figura 14, panel A). Para lograr el equilibrio, el vapor de agua deja la gota y eventualmente se condensa en el reservorio. A medida que el agua deja la gota, la muestra sufre un incremento hasta lograr una supersaturación relativa. Tanto la muestra como el reactivo incrementan en concentración a medida que el agua deja la gota del reservorio. El equilibrio se alcanza cuando la concentración del reactivo en la gota es aproximadamente la misma que la del reservorio (Figura 14, panel B).

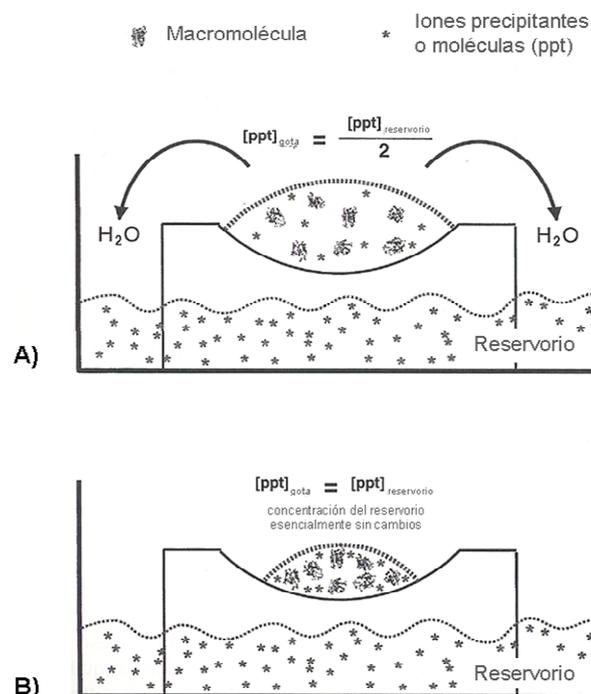


Figura 14. Principio de la cristalización por el método de sitting-drop. **A)** El equilibrio tiene lugar a través de la fase de vapor. **B)** El volumen de la gota decrece, incrementándose la concentración de precipitante y proteína (adaptada de McPherson 1999).

El método tiene varias ventajas: se requiere poca cantidad de proteína, se monitorea fácilmente la formación de cristales, se almacena en espacios reducidos y se realiza simultáneamente el escrutinio de un gran número de condiciones (McPherson 1999).

1.4.2 Difusión líquido-líquido

En este método se coloca la muestra en contacto líquido con el precipitante. Al hacer esto se crea una interfase claramente definida entre la muestra y el precipitante. A lo largo del tiempo, la muestra y el precipitante difunden uno en otro y la cristalización puede ocurrir en la interfase, en el lado de muestra concentrada / precipitante diluido o en el lado de muestra diluida / precipitante concentrado. La técnica permite un análisis de gradiente de combinaciones de concentración de muestra y precipitante. La técnica puede llevarse a cabo en pequeños capilares (Figura 15).

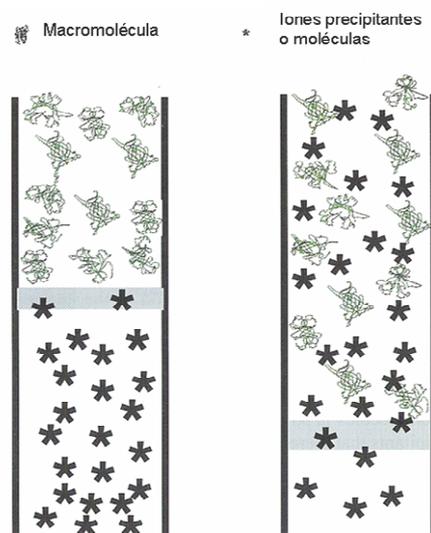


Figura 15. Principio de la cristalización por el método de difusión líquido-líquido (McPherson 1999).

La técnica de difusión líquido-líquido, también conocida como difusión de interfase libre, es un método de crecimiento de cristales de proteína que adquiere ventajas técnicas en un ambiente de microgravedad. No solo se elimina el mezclado turbulento ocasionado por las diferencias de densidad en la interfase de los líquidos que se difunden, sino que además se evita la remoción de cristales de las zonas óptimas de crecimiento por la sedimentación (McPherson 1999).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Sobreexpresar y purificar las proteínas recombinantes no estructurales NSP5 y NSP6 de rotavirus, utilizando a *Escherichia coli* como sistema de expresión

2.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Subclonar las proteínas no estructurales NSP5 y NSP6 de rotavirus porcino en diversos vectores de clonación
- Determinar las condiciones de expresión para cada proteína en los distintos vectores utilizados
- Determinar estrategias de purificación adecuadas de las proteínas heterólogas a cada caso según las características del plásmido utilizado
- Analizar la actividad de las proteínas purificadas y realizar ensayos preliminares para la formación de cristales de las proteínas NSP5 y NSP6

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental empleada en la presente tesis se esquematiza en la Figura 16.

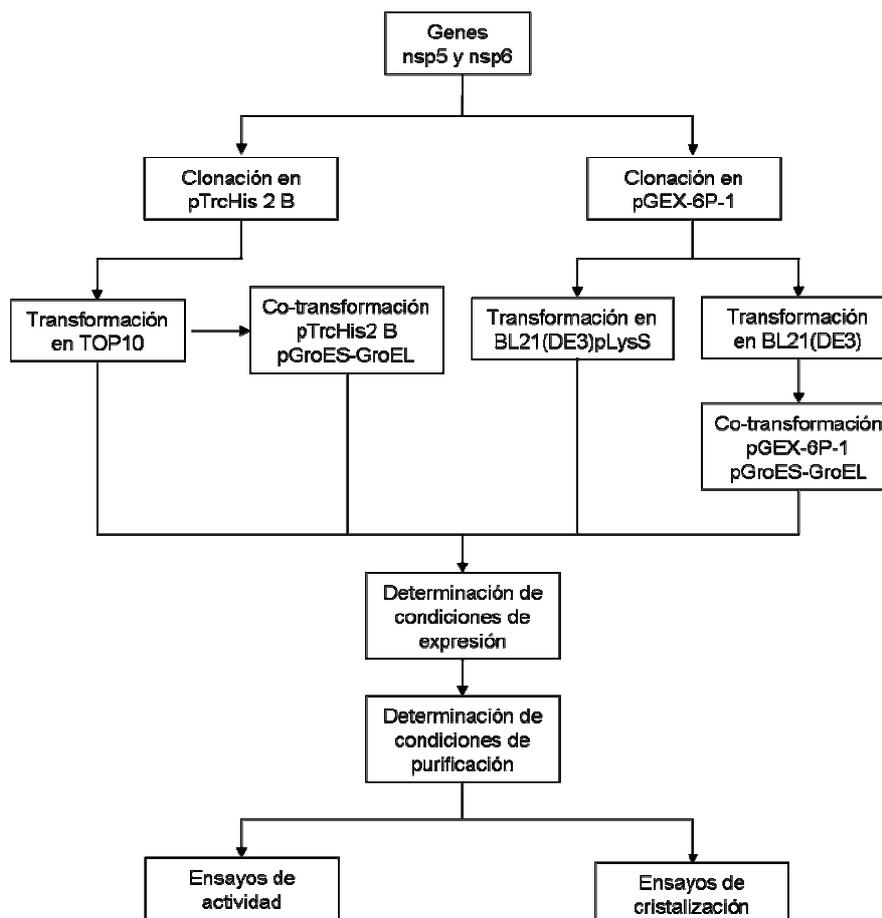


Figura 16. Estrategia experimental empleada en la tesis.

3.2 CONSTRUCCIÓN DE VECTORES DE EXPRESIÓN

El gen que codifica para la proteína NSP5 de rotavirus porcino YM clonado en el plásmido pET-28a(+) (Novagen) fue donado por el Dr. Carlos Arias del Instituto de Biotecnología de la UNAM (Torres-Vega y col. 2000). Los genes nsp5 y nsp6 de

Los fragmentos amplificados fueron ligados en el plásmido de interés, previamente digeridos con las enzimas de restricción utilizadas en el diseño de los oligonucleótidos. Con cada construcción se transformaron células competentes de la cepa de *E. coli* TOP10 (Ver Anexo 7.3). Las clonas positivas se seleccionaron inicialmente por digestión de su ADN plasmídico. Las construcciones en pTrcHis2 B y pGEX-6P-1 se verificaron por secuenciación. El ADN plasmídico de las construcciones en pGEX-6P-1 se utilizó para transformar las cepas de *E. coli* BL21(DE3) pLysS (Ver Anexo 7.3) recomendadas para la expresión (Tabla 5).

Tabla 5. Características de las construcciones realizadas.

Clave	Inserto	Plásmido	Cepa
5T	NSP5	pTrcHis2 B	TOP10
6T	NSP6	pTrcHis2 B	TOP10
5TG	NSP5	pTrcHis2 B / pGroES-GroEL	TOP10
6TG	NSP6	pTrcHis2 B / pGroES-GroEL	TOP10
5G	NSP5	pGEX-6P-1	BL21(DE3)pLysS
6G	NSP6	pGEX-6P-1	BL21(DE3)pLysS
5GG	NSP5	pGEX-6P-1 / pGroES-GroEL	BL21(DE3)
6GG	NSP6	pGEX-6P-1 / pGroES-GroEL	BL21(DE3)

En el caso de las co-transformantes, después de la confirmación de la presencia de la construcción de interés, se transformó la cepa con el plásmido pGroES-GroEL (Figura 18). La presencia de ambos plásmidos fue confirmada por digestión y análisis en geles de agarosa.

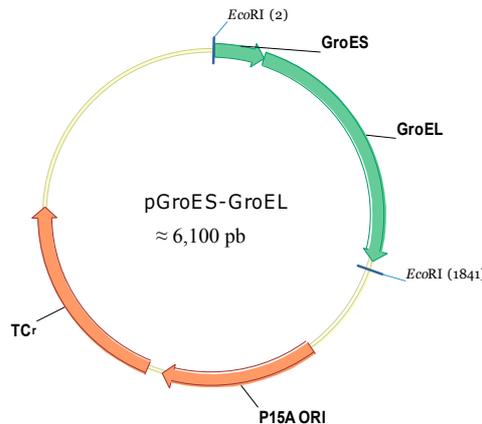


Figura 18. Plásmido pGroES-GroEL (Bergès y col. 1996).

Las colonias confirmadas se almacenaron a largo plazo en ultracongelación mediante respaldos en glicerol. La relación de las construcciones realizadas en la presente tesis se resume en la Tabla 5.

3.2.1 Metodología

3.2.1.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La mezcla de reacción se preparó manteniéndola en hielo. Para cada reacción se utilizaron 1 μg de ADN molde, 0.5 μg de cada oligonucleótido, 0.3 mM de dNTPs, 1.5 mM de MgCl_2 , 2.5 U de Taq ADN polimerasa (Invitrogen) y buffer PCR 1X en un volumen final de 50 μL . El programa de amplificación se programó con un calentamiento inicial a 94°C por 5 min, seguido por 30 ciclos de 94°C por 30 s / 53°C por 30 s / 72°C por 1 min y una amplificación final a 72°C durante 10 min. Los productos de la amplificación se analizaron en geles de agarosa.

3.2.1.2 Geles de agarosa al 0.8%

La agarosa se disolvió en TAE 1X (Ver anexo 7.6) y se le adicionó 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de bromuro de etidio. Las muestras se prepararon mezclando en un relación 1:10 de muestra:volumen de buffer carga de ADN. El TAE 1X se utilizó como buffer de corrida. El marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (Invitrogen) se utilizó como referencia. Los geles se analizaron en transiluminador y se digitalizaron.

3.2.1.3 Digestión con enzimas de restricción

Cada digestión se preparó con 1-10 μg de ADN, 1 U de enzima, buffer de reacción 1X final y BSA de acuerdo a las recomendaciones del proveedor, en un volumen final de 15 - 20 μL . Las reacciones se incubaron a 37°C por 2 h en termoblock y los productos obtenidos se analizaron en geles de agarosa.

3.2.1.4 Ligación

La relación inserto:vector se determinó mediante un análisis visual comparativo en gel de agarosa. La ligación se realizó en un volumen final de 20 μL con 1 U de T4 DNA ligasa (Invitrogen), 4 μL de Ligase Reaction Buffer 5X y 3:1 de relación inserto:vector. La reacción se incubó a 25°C por 20 min y luego a 4°C durante toda la noche. Una reacción sin inserto se preparó en las condiciones anteriores y se usó control negativo de la digestión.

3.2.1.5 Células competentes (Método cloruro de rubidio)

Las células de *E.coli* se crecieron en medio LB a 37°C hasta una $\text{OD}_{600} \approx 0.6$, se transfirieron a un tubo de centrifuga y se incubaron por 15 min en hielo. Las células se recuperaron por centrifugación a 3,000 rpm por 15 min a 4°C y se lavaron en 11 mL de buffer RF1 (Ver anexo 7.6). Las células se incubaron nuevamente en hielo, se centrifugaron y se recuperaron en 2.6 mL de buffer RF2 (Ver anexo 7.6). Las células se alícuotaron para su almacenaje a -70°C o para su utilización inmediata.

3.2.1.6 Transformación (Choque térmico)

A cada alícuota de células competentes se le agregó de 1 a 5 μL de ADN. El choque térmico se realizó incubando de 15 a 30 min en hielo, 45 s a 42°C y 2 min en hielo. Las células se incuban en 250 μL de medio LB a 37°C con agitación durante 1 h. Las células se plaquearon en cajas LB agar (Ver anexo 7.6) con antibiótico y se incubaron a 37°C toda la noche.

3.2.1.7 Minipreparaciones (Birnboim y Doly)

Las células de 3 mL de cultivo incubadas durante toda la noche se recuperaron por centrifugación y se resuspendieron en 100 μ L de solución I. Las células se incubaron con 200 μ L de solución II y con 150 μ L de solución III (Ver anexo 7.6). La mezcla se centrifugó para descartar los restos celulares. El sobrenadante se mezcló con 500 μ L de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y se centrifugó. El sobrenadante se mezcló con 500 μ L de cloroformo y se separó por centrifugación. El ADN plasmídico recuperado en el sobrenadante se incubó con 500 μ L de isopropanol a -20°C durante al menos 1 h, se centrifugó y se decantó. El pellet se lavó con 500 μ L de etanol al 70%. El ADN se rehidrató en agua y el ARN se eliminó con un tratamiento con 0.25 μ g de ARNasa (Invitrogen) por 20 min a 25°C seguido de la inactivación de la enzima a 50°C por 2 min.

3.2.1.8 Respaldos en glicerol

0.9 mL de cultivo a una $\text{OD}_{600} \approx 0.5$ se mezclaron con 0.1 mL de glicerol 80% estéril y la mezcla se almacenó a -70°C .

3.3 EXPRESIÓN

Las clonas positivas obtenidas por análisis de ADN se utilizaron en ensayos de expresión (5 mL) para seleccionar la clona productora de una mayor cantidad de proteína recombinante en extractos totales. Una vez seleccionada, se realizaron ensayos de expresión (25 mL) y se estandarizaron condiciones adecuadas de temperatura, concentración de inductor, densidad óptica al inducir y tiempo de incubación posterior a la inducción. Se realizó un análisis por densitometría de los patrones electroforéticos para comparar la cantidad de proteína producida entre cada uno de los distintos sistemas y condiciones de expresión. Se determinó la fracción celular en la cual se acumula la proteína recombinante producida y si ésta se encuentra presente en forma soluble o insoluble.

Una vez estandarizadas las condiciones de expresión para cada construcción, se realizó una expresión (500 mL) para la realización de análisis posteriores de actividad y cristalización. La cantidad de proteína total obtenida al final de cada lote de expresión se cuantificó (Protein Assay Bio-Rad) y se determinó la cantidad relativa de proteína recombinante producida por densitometría.

Para confirmar que la proteína observada en geles de acrilamida correspondía a la proteína de interés, se realizó un análisis Western blot utilizando anticuerpos contra las histidinas en el caso de las construcciones en el vector pTrcHis2 B.

3.3.1 Metodología

3.3.1.1 Ensayos de expresión (5 mL)

Las clonas seleccionadas se cultivaron en matraces (5 mL) con los antibióticos correspondientes a 37°C hasta una $OD_{600} \approx 0.6$. Se tomó una muestra de 100 μ L y se concentró en un volumen final de 10 μ L (Fracción: Antes de la inducción). El cultivo se indujo con 0.1 mM IPTG a 37°C durante 3 h. Las células colectadas de una fracción de 1.5 mL se resuspendieron en 300 μ L de buffer de lavado (Ver

anexo 7.6) y se sonicaron durante 20 s (Fracción: Después de la inducción). Las fracciones colectadas se analizaron en geles de acrilamida.

3.3.1.2 Ensayos de expresión (25 mL)

Varios cultivos de 60 mL de LB con antibiótico se incubaron a la temperatura indicada (28 o 37°C) hasta una $OD_{600} \approx 0.4, 0.6$ ó 1.0 (Fracción: Antes de la inducción). Los cultivos se indujeron con IPTG (0.1, 0.4 ó 1 mM) a la temperatura indicada durante el tiempo de incubación de interés (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 14 h). Las células se colectaron por centrifugación, se resuspendieron en 600 μ L de buffer de lavado y se sonicaron por 20 s (Fracción: Proteína total). La muestra se centrifugó para separar las fracciones y se recuperó el sobrenadante (Fracción: Soluble en Tris). Al pellet residual se le agregaron 600 μ L de buffer de guanidina fosfatos (Ver anexo 7.6) y se sonicó por 30 s. El sobrenadante se separó por centrifugación (Fracción: Soluble en el 1^{er} tratamiento con guanidina) y al pellet residual se le realizó un segundo tratamiento con buffer guanidina fosfatos (Fracción: Soluble en el 2^{do} tratamiento con guanidina). Las fracciones colectadas se analizaron en geles de acrilamida.

3.3.1.3 Ensayos de expresión (500 mL)

Se realizaron expresiones a nivel mayor, 500 mL, induciendo de la misma manera que en los ensayos de 5 y 25 mL. El pellet se colectó por centrifugación y se resuspendió en 4 mL de buffer de lavado. Las células se sonicaron por 4 min y el sobrenadante se separó por centrifugación (Fracción: Soluble en Tris). Al pellet residual se le agregaron 5 mL de buffer de guanidina fosfatos y el sobrenadante se sonicó por 4 min y se centrifugó (Fracción: Soluble en el 1^{er} tratamiento con guanidina). Al pellet residual se le agregaron 4 mL de buffer de guanidina fosfatos y el sobrenadante se sonicó por 2 min y se recuperó por centrifugación (Fracción: Soluble en el 2^{do} tratamiento con guanidina). Las fracciones colectadas se analizaron en geles de acrilamida.

3.3.1.4 Preparación de geles de acrilamida Tris-Tricina 4 y 15% (SDS-PAGE)

Los geles (separador y concentrador) se prepararon de acuerdo a la Tabla A1 y se armó la cámara vertical de electroforesis. La cámara se llenó con buffer del cátodo (interno) (Ver anexo 7.6) y con buffer del ánodo (externo) (Ver anexo 7.6) hasta cubrir el electrodo. Las muestras se hirvieron por 5 min y se diluyeron con un volumen de buffer de carga (980 μ L Tricine sample buffer + 20 μ L 2-ME). Las muestras se cargaron en los pozos y la separación se realizó a 20 mA.

3.3.1.5 Tinción de geles de poliacrilamida (Coomassie)

Los geles de poliacrilamida se tiñieron en solución de teñido (Ver anexo 7.6) y se destiñeron en solución de desteñido (Ver anexo 7.6) hasta que las bandas de proteínas fueron visibles con el menor fondo posible.

3.3.1.6 Densitometría

Cada gel se analizó individualmente haciendo uso del Molecular Imaging Software v.4.0.3 y del equipo Gel Logic 100 Imaging System de Kodak. El análisis se realizó por triplicado (distintos lotes de expresión) para cada construcción y se reportó el promedio observado.

3.3.1.7 Cuantificación de proteína (Bradford)

El reactivo se preparó mezclando 1 parte de Protein Assay Dye Reagent Concentrate con 4 partes de agua bi-destilada. Diluciones de BSA se prepararon para usarlas como estándar (Ver Tabla A2). Alícuotas de 20 μ L de cada estándar o muestra se mezclaron con 1 mL de reactivo diluido y se incubaron 5 min a temperatura ambiente. Cada reacción se midió a OD₅₉₅ y se comparó con la curva estándar de BSA para determinar la cantidad de proteína.

3.3.1.8 Análisis Western blot

Las proteínas separadas en un gel de acrilamida se transfirieron a membrana PVDF (0.45 μ m, GE Osmonics) usando buffer de transferencia (Ver anexo 7.6) en cámara semihúmeda a 10 V por 50 min. El gel de acrilamida se tiñó con Coomassie para confirmar la transferencia y la membrana con rojo de Ponceau

(Ver anexo 7.6). La membrana se destiñó completamente en agua destilada, se lavó con PBS (Ver anexo 7.6) y se bloqueó con BSA al 3% durante 1 h. La membrana se incubó con el anticuerpo toda la noche y se le realizaron 3 lavados con PBST (Ver anexo 7.6) y uno con PBS. La membrana se reveló en buffer de fosfatasa alcalina (Ver anexo 7.6) con 16.5 μ L BCIP y 33 μ L de NBT. La reacción se detuvo en agua destilada.

3.4 PURIFICACIÓN

Una vez que se establecieron los protocolos de expresión para cada una de las construcciones, se determinaron las condiciones de purificación adecuadas. En el caso de las construcciones realizadas en el plásmido pTrcHis2 B, el dominio de unión a metal (His)₆ permitió la purificación de la proteína recombinante por cromatografía de afinidad a metales inmovilizados utilizando la resina ProBond™ Nickel-Chelating Resin (Invitrogen) que contiene níquel como ligando. La fusión a la proteína GST producida por la expresión en el vector pGEX-6P-1, permite la purificación mediante cromatografía de afinidad usando la resina Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare).

3.4.1 Metodología

3.4.1.1 Purificación pTrcHis2 B (resina ProBond)

La resina ProBond (500 µL) fue lavada tres veces con 1 mL de agua y se equilibró con 1 mL de buffer de lavado. Una vez equilibrada se agregó 1 mL de muestra y se permitió la unión durante toda la noche. La resina se centrifugó para retirar el sobrenadante y se lavó 4 veces con 1 mL buffer limpieza 1 (Ver anexo 7.6) y 4 veces con 1 mL buffer limpieza 2 (Ver anexo 7.6). La proteína unida a la resina se recuperó lavando 2 veces con 1 mL imidazol por 12 h. La columna se lavó con 1 mL agua y se guardó en 500 µL EtOH 20%. La proteína recuperada se dializó contra 500 mL Tris-HCl 10 mM pH 12.0 en membranas de diálisis (6000 mol wt cutoff, dialysis tubing; Sigma), se liofilizó y se resuspendió en 200 µL de agua. La proteína se cuantificó (Bio-Rad protein assay) y su pureza se verificó en geles de acrilamida.

3.4.1.2 Purificación pGEX-6P-1 (resina Glutathione Sepharose 4B)

200 µl de resina Glutathione Sepharose 4B se lavaron 3 veces con PBS 1X y se equilibraron con 200 µl buffer guanidina 6 M (Ver anexo 7.6). 1 mL de muestra se

agregó a la columna y se permitió la unión incubando por 1 h. La resina se centrifugó y se retiró el sobrenadante. La resina se lavó 3 veces con PBS 1X y 3 veces con 200 μ l buffer glutathione (Ver anexo 7.6). El sobrenadante de los lavados con buffer glutathione se recuperó y se analizó en geles de acrilamida. La columna se lavó con 1 mL agua y se almacenó en 500 μ l EtOH 20%.

3.5 ANÁLISIS DE ACTIVIDAD

Se realizaron diversos ensayos para establecer las condiciones que favorecen la actividad ATPasa de las proteínas NSP5 y NSP6 de rotavirus tales como el pH y la temperatura. Se compararon las diferencias de actividad entre las distintas proteínas. Además, se realizó un análisis de actividad ATPasa en gel para confirmar que la actividad observada se debe a la proteína de interés purificada y no a las trazas de proteínas contaminantes que no se pudieron eliminar durante el proceso de purificación.

3.5.1 Metodología

3.5.1.1 Ensayo de actividad ATPasa

Se realizaron modificaciones a los protocolos propuestos por Eichelberg y col. en 1994 y por Santos y col. en el 2004. Una mezcla de reacción (900 μL) formada por 100 ng/100 μL de proteína purificada, 100 μL de buffer de reacción 10X (Ver anexo 7.6), 100 μL de ATP (10 mM) y 700 μL de agua se preparó manteniéndola a 4°C. La reacción se llevó a cabo durante el tiempo y la temperatura indicados a 300 rpm en termomixer. A alícuotas de 100 μL retiradas en varios tiempos (1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 y 40 min) se les agregaron 800 μL de reactivo de color (Ver anexo 7.6), se incubaron durante 1 min a temperatura ambiente y se les añadieron 100 μL de citrato de sodio al 34%. Cada reacción se dejó incubar a temperatura ambiente (30-60 min) y se midió a OD₆₆₀. Cada experimento se realizó por duplicado y se midió en paralelo con una curva estándar de KH₂PO₄ (Ver Tabla A3).

3.5.1.2 Ensayo de actividad ATPasa en gel

Se adaptó el protocolo según lo propuesto por Kim y col. en el 2000 y por Fan y col. en 1996. Un gel horizontal (10.2 cm X 6.1 cm X 4 mm) de agarosa al 1% se preparó en buffer de corrida (Ver anexo 7.6) con los pozos en el centro del gel. Las muestras (30 μg) se mezclaron con un volumen de buffer de carga nativo (Ver

anexo 7.6) y se corrieron en dos carriles. La electroforesis se realizó en buffer de corrida a 50 V durante 2 h. Los dos carriles se separaron y uno se tiñó en solución de tinte para agarosa (Ver anexo 7.6) por 20 min y se destiñó luego en solución de destiñido para agarosa (Ver anexo 7.6). El otro carril se incubó por 30 min a 37°C con 1 mL de buffer de reacción, se tiñó con el reactivo de color por 20 min y se estabilizó con citrato de sodio al 34%.

3.6 CRISTALIZACIÓN

Para realizar los ensayos de escrutinio preliminar de las condiciones adecuadas para la cristalización de cada una de las proteínas purificadas, se utilizaron los kits Crystal Screen 1 y 2 de Hampton Research Corp. que utilizan el enfoque del sitting-drop.

De manera simultánea, se realizaron análisis de monitoreo de cristalización por el método de difusión líquido-líquido por el Dr. Abel Moreno Cárcamo del Instituto de Química de la UNAM.

3.6.1 Metodología

3.6.1.1 Ensayos de cristalización

Las cajas de cristalización Cryschem™ plate (Hampton Research Corp.) se etiquetaron y se colocaron 800 μL de cada una de las soluciones de los kits Crystal Screen™ 1 y 2 en la parte inferior de las cajas de cristalización y 20 μL de cada una de las soluciones correspondientes en la parte superior de las cajas. 5 μL de proteína purificada (5-10 mg/mL) se colocaron en la parte superior de la cajas y se mezclaron con la solución del kit evitando la formación de burbujas. La caja de cristalización se selló con cinta adhesiva, se incubó a temperatura ambiente y se monitoreo la formación de cristales.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 CLONACIÓN

La proteína NSP5 de rotavirus es una de las proteínas más importantes involucradas en la replicación del rotavirus dentro de células infectadas. La proteína NSP6 es codificada por el mismo segmento de ADN que NSP5 en un marco de lectura de +1. Aunque no existen muchos estudios, se ha especulado que NSP6 tiene un posible papel regulatorio sobre la función de NSP5. En este trabajo, se sobre-expresaron las proteínas no estructurales de rotavirus NSP5 y NSP6 en un sistema recombinante como una estrategia para obtener suficiente proteína para estudiar las propiedades funcionales y estructurales de ambas proteínas.

Escherichia coli fue seleccionado como sistema de expresión para las proteínas NSP5 y NSP6 de rotavirus debido a que es el hospedero usado con mayor frecuencia para la expresión de proteínas y se ha descrito a menudo como un sistema eficiente para la producción de proteínas para la cristalografía por rayos X. (Goulding y Perry 2003).

El primer paso para la sobre-expresión heteróloga de las proteínas NSP5 y NSP6 de rotavirus en *E. coli*, fue su clonación en distintos vectores de expresión según lo descrito en Materiales y Métodos.

4.1.1 Construcción de vectores en pTrcHis2 B

El vector pTrcHis2 B fue seleccionado debido a que presenta características favorables para la sobre-expresión: a) favorece la producción de proteínas tóxicas para la célula proporcionando una fuerte regulación de la expresión al contener el gen que codifica para el represor Lac (*lacIq*), b) permite altos niveles de expresión por su promotor híbrido trc (*trp-lac*) y c) codifica para una región de poli-histidinas en el extremo C-terminal de la proteína recombinante lo que facilita su purificación por afinidad a iones metálicos.

Los productos de PCR obtenidos con los oligonucleótidos diseñados para pTrcHis2 B (Tabla 3) correspondieron al peso molecular esperado de 603 pb para NSP5 (Figura 19A carril 1) y de 277 para NSP6 (Figura 19B, carril 1).

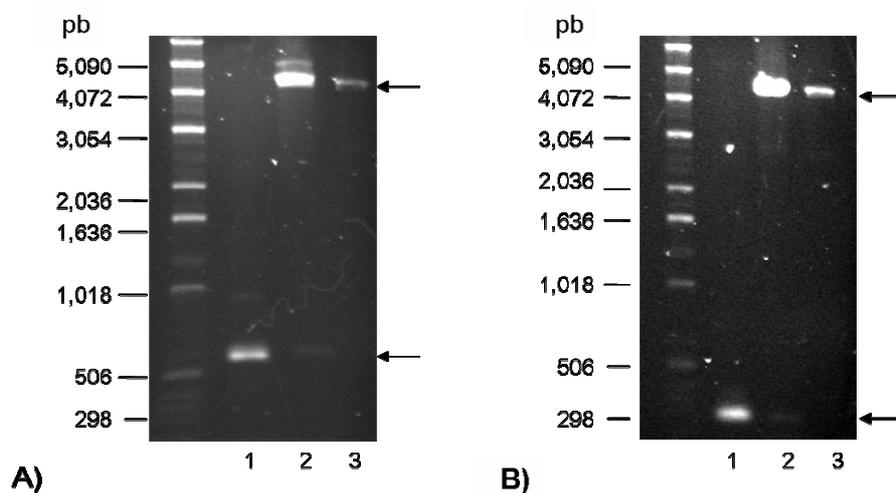


Figura 19. Análisis en geles de agarosa de las construcciones **A)** NSP5 y **B)** NSP6 en pTrcHis2 B. Carril 1, PCR del fragmento de interés; carril 2, liberación por digestión de fragmento y plásmido pTrcHis2 B; carril 3, plásmido pTrcHis2 B linearizado. Las flechas indican los pesos moleculares esperados. Geles de agarosa 0.8% teñidos con bromuro de etidio.

Los fragmentos amplificados fueron digeridos con las enzimas de restricción seleccionadas y ligados en el vector pTrcHis2 B. Las construcciones NSP5-pTrcHis2 B y NSP6-pTrcHis2 B fueron confirmadas por la restricción y liberación del fragmento (Figura 19A carril 2 y Figura 19B carril 2 respectivamente). Se utilizó al vector pTrcHis2 B linearizado (Figura 19 A y B, carriles 3) como control del peso molecular esperado. Las construcciones fueron confirmadas posteriormente por secuenciación. Este proceso se realizó para todas las clonas seleccionadas para la expresión con resultados similares a los mostrados en la Figura 19.

4.1.2 Construcción de vectores en pGEX-6P-1

El plásmido pGEX-6P-1 fue seleccionado debido a que permite la expresión de las proteínas fusionadas a la proteína Glutathione S-transferasa (GST) en el extremo

N-terminal. Esta fusión permite la purificación de la proteína recombinante por afinidad con Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare). Adicionalmente, es posible retirar el dominio GST (26 kDa) una vez purificada la proteína usando la enzima PreScission Protease que reconoce una región específica entre GST y el sitio de clonación múltiple. La expresión se encuentra bajo el control del promotor *tac* por lo que es inducible con IPTG. La proteína producida se acumula en el citoplasma de la célula (Amersham Biosciences, edition AA, 2002).

Las construcciones NSP5-pGEX-6P-1 y NSP6-pGEX-6P-1 se utilizaron para transformar la cepa BL21(DE3) pLysS de *E.coli*. En la Figura 20 se observan las bandas correspondientes a los pesos moleculares esperados: para el plásmido pLysS es de 4.8 kb, para el plásmido NSP5-pGEX es de 5.5 kb (Figura 20 carril 1) y para el plásmido NSP6-pGEX de 5.2 kb (Figura 20 carril 3). En el carril 2 de la Figura 20 se observa el plásmido pGEX-6P-1 (4.9 kb) linearizado usado como referencia. Las construcciones fueron verificadas posteriormente por secuenciación.

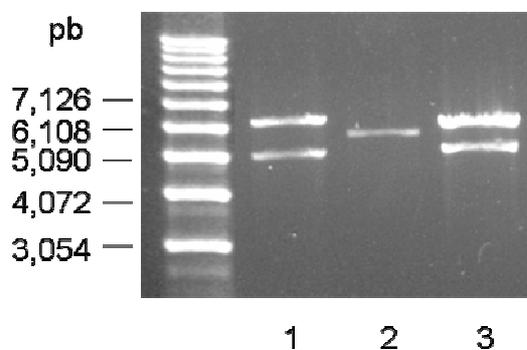


Figura 20. Análisis en geles de agarosa de las construcciones NSP5 y NSP6 en pGEX6P-1. Carril 1, NSP5-pGEX; carril 2, pGEX; carril 3, NSP6- pGEX; digeridos con *Bam*HI. Geles de agarosa 0.8% teñidos con BrEt.

4.1.3 Co-transformantes con el vector pGroES-GroEL

La producción de proteínas recombinantes en bacteria a menudo se ve afectada por la formación de cuerpos de inclusión. En algunos casos, este problema puede

disminuirse con la sobre-producción simultánea de chaperonas moleculares (Walter y col. 2002). En este trabajo se incluyó el plásmido pGroES-GroEL con un peso de 6.1 kb (Bergès y col. 1996) en un intento por obtener una mayor cantidad de proteína soluble lo que facilita el proceso posterior de purificación.

Las cepas de *E. coli* transformadas con las construcciones en pTrc y en pGEX fueron co-transformadas con el plásmido sobre-expresante de las chaperonas GroES-GroEL. El ADN plasmídico de las cepas co-transformantes fue aislado y analizado por restricción. El plásmido pGroES-GroEL digerido con *EcoRI* produce dos bandas bien diferenciadas de 4.3 y 1.8 kb (Figura 21 A y B, carriles 3), mientras que para las construcciones NSP5-pTrc, NSP6-pTrc, NSP5-pGEX y NSP6-pGEX la digestión con *EcoRI* produce bandas de 5.0 (Figura 21A carril 2), 4.7 (Figura 21A carril 4), 5.5 (Figura 21B carril 2) y 5.2 (Figura 21B carril 4) respectivamente. De esta manera, se identifica fácilmente la presencia de ambos plásmidos usando a los vectores individuales (Figura 21 A y B, carriles 1, 3 y 5) como controles de peso molecular esperado.

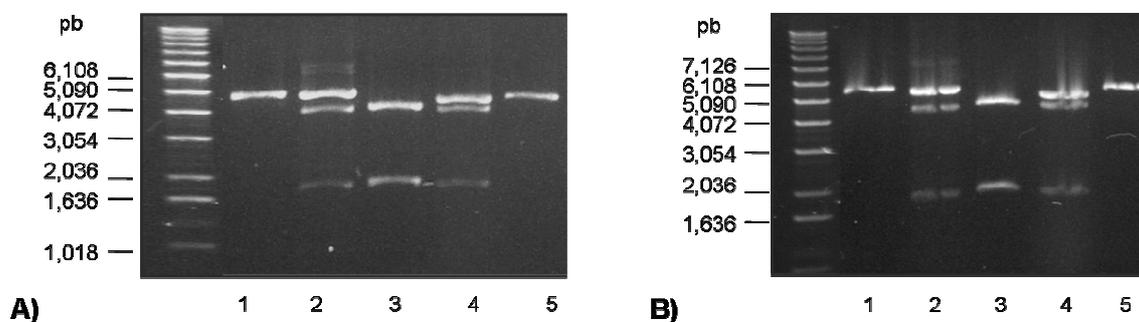


Figura 21. Análisis en geles de agarosa de las construcciones NSP5 y NSP6 en **A)** pTrcHis2 B / pGroES-GroEL: carril 1, NSP5-pTrc; carril 2, NSP5-pTrc-pGro; carril 3, pGro; carril 4, NSP6-pTrc-pGro; carril 5, NSP6-pTrc; digeridos con *EcoRI*. **B)** pGEX6P-1 / pGroES-GroEL: carril 1, NSP5-pGro; carril 2, NSP5-pGEX-pGro; carril 3, pGro; carril 4, NSP6-pGEX-pGro; carril 5, NSP6-pGEX; digeridos con *EcoRI*. Geles de agarosa 0.8% teñidos con BrEt.

4.2 EXPRESIÓN

Las proteínas recombinantes NSP5 y NSP6 de rotavirus se sobre-expresaron usando dos vectores de clonación (pTrcHis2 B y pGEX-6P-1) y la co-expresión recombinante de las chaperonas moleculares GroES y GroEL (Tabla 4). Las clonas de cada construcción fueron seleccionadas inicialmente con base en la mayor cantidad de proteína recombinante producida. Las condiciones de temperatura, concentración de inductor y tiempo de incubación que favorecieron la expresión fueron determinadas para cada clona. La proteína producida por las distintas construcciones se comparó en términos de cantidad y solubilidad.

4.2.1 Expresión NSP5 y NSP6 en pTrcHis2 B

La expresión de las construcciones en pTrcHis2 B se analizó en un primer escrutinio en la cepa de *E. coli* TOP10. Las condiciones en las que se obtuvo una mayor cantidad de proteína recombinante en medio LB fueron: incubación a 37°C, inducción con 0.1 mM IPTG y recuperación 4 h posteriores a la inducción (Figura 22 A y B carriles 3).

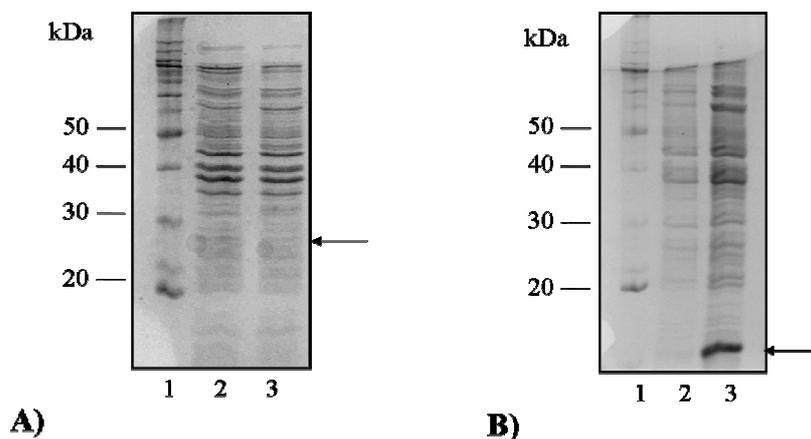


Figura 22. Análisis por SDS-PAGE de la expresión de las construcciones **A)** NSP5 (27 kDa) y **B)** NSP6 (16 kDa) en pTrcHis2 B en un primer escrutinio. Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, extractos de proteína total antes de la inducción; carril 3, extractos de proteína total después de la inducción. Las flechas indican el tamaño de proteína esperado.

Los pesos moleculares teóricos para las proteínas NSP5 y NSP6 son de 22 y 11 kDa respectivamente. Las proteínas recombinantes expresadas en el vector pTrcHis2 B presentan un peso molecular superior al de la proteína nativa en aproximadamente 4.3 kDa debido a la presencia de aminoácidos adicionales (entre los que se encuentran seis histidinas adicionales y el epítipo myc que permite el reconocimiento de la proteína mediante el uso de anticuerpos) en el extremo N-terminal. Los pesos moleculares observados (Figura 22 A y B) para las proteínas NSP5 (27 kDa) y NSP6 (16 kDa) corresponden a lo esperado. Aparentemente, la proteína NSP5 (Figura 22A) es altamente tóxica para las células de *E. coli* debido a la baja expresión de proteína recombinante observada en comparación con la expresión de la proteína NSP6 (Figura 22B).

La solubilidad de la proteína recombinante se determinó en geles de acrilamida. La proteína NSP5 expresada en el vector pTrcHis2 B es difícil de apreciar a simple vista en todas sus fracciones (Figura 23A carriles 3, 4 y 5) debido a su baja expresión. La proteína NSP6 se observó en los extractos totales de *E. coli* después de la inducción (Figura 23B carril 3) y en la fracción insoluble en Tris (Figura 23B carril 5), probablemente formando cuerpos de inclusión.

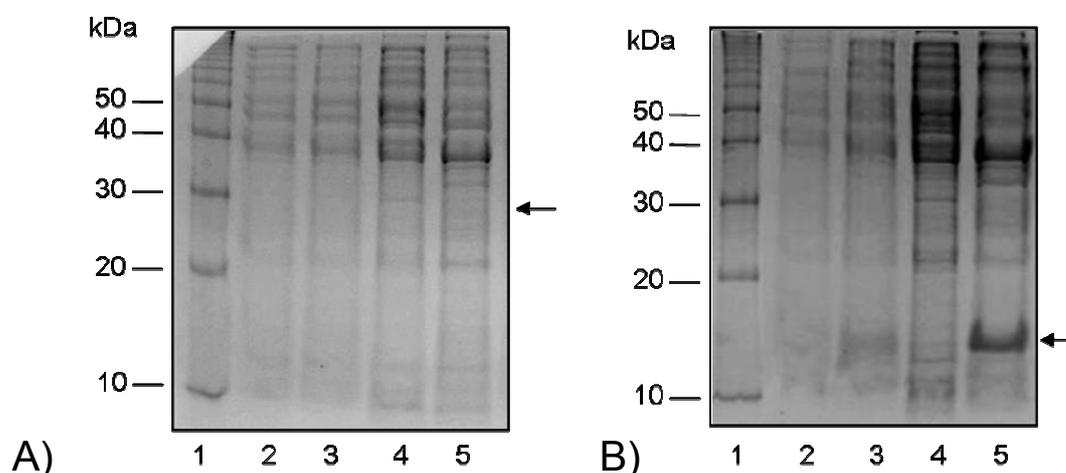


Figura 23. Análisis por SDS-PAGE de las fracciones (soluble e insoluble en Tris) de la expresión de las construcciones **A)** NSP5 (27 kDa) y **B)** NSP6 (16 kDa) en pTrcHis2 B. Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, extractos de proteína total antes de la inducción; carril 3, extractos de proteína total después de la inducción; carril 4, fracción soluble en Tris después de la inducción; carril 5, fracción insoluble en Tris después de la inducción. Las flechas indican el tamaño de proteína esperado.

En algunos casos de sobre-expresión de proteínas heterólogas en *E.coli*, se ha reportado la sobre-expresión de la proteína DnaJ nativa. (Amersham Pharmacia Biotech. 1997). En algunas fracciones de la expresión de las proteínas se observó la presencia de una banda muy diferenciada de aproximadamente 37 kDa (Figura 23 A y B, carriles 4 y 5) que corresponde al peso molecular de la chaperona DnaJ.

Un segundo escrutinio entre las clonas obtenidas con el vector pTrcHis2 B (Figura 24 A y B) fue realizado para obtener una mayor cantidad de proteína.

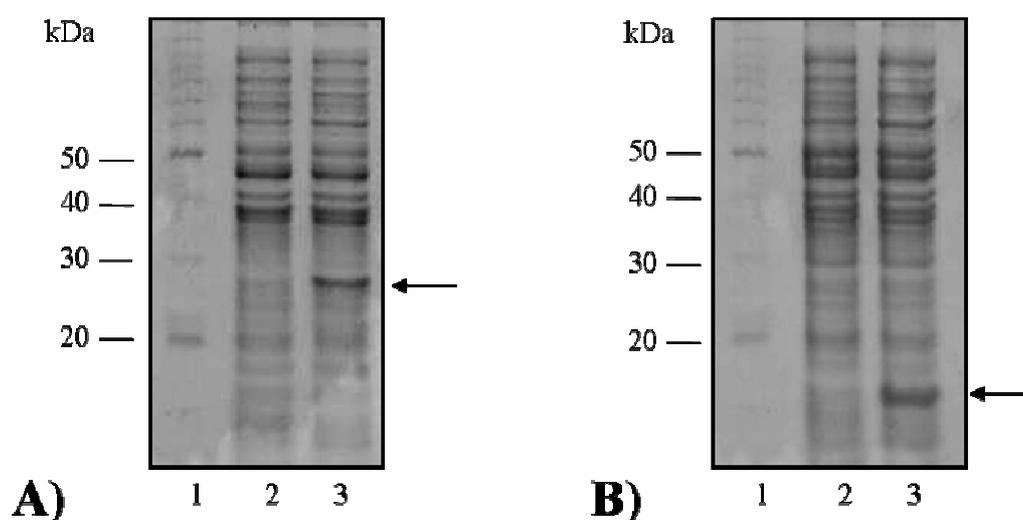


Figura 24. Análisis por SDS-PAGE de la expresión de las construcciones **A)** NSP5 (27 kDa) y **B)** NSP6 (16 kDa) en pTrcHis2 B en un segundo escrutinio. Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, extractos de proteína total antes de la inducción; carril 3, extractos de proteína total después de la inducción. Las flechas indican el tamaño de proteína esperado.

Contrariamente a lo que se había observado, se encontraron clonas productoras de una mayor cantidad de proteína (Figura 25 A y B carriles 1) que además fueron capaces de expresar una fracción soluble en Tris (Figura 25 A y B carriles 2). Para favorecer la solubilización del pellet insoluble resultante del tratamiento con Tris, se agregaron dos tratamientos adicionales con guanidina (Figura 25 A y B carriles 3 y 4). Las condiciones de expresión encontradas para las nuevas clonas en medio LB fueron: incubación a 37°C, inducción a 0.1 mM IPTG y recuperación 6 h de incubación después de la inducción, a diferencia de lo observado con la clonas

antes seleccionadas (4 h posteriores a la inducción). Esta observación no constituye un hecho aislado debido a que existen reportes de diferencias entre las condiciones de expresión de clonas isogénicas recombinantes (De León y col. 2004).

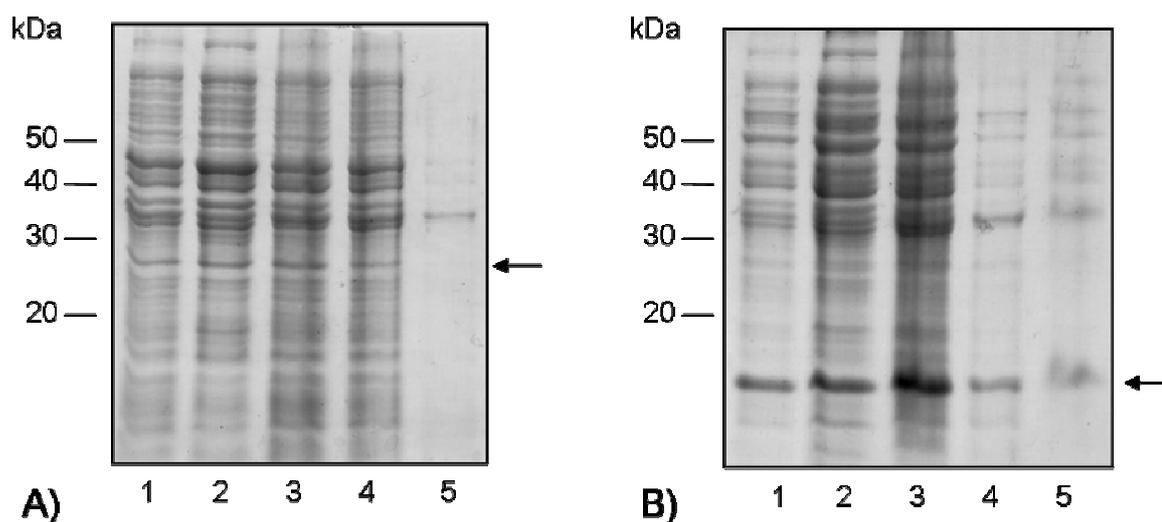


Figura 25. Análisis por SDS-PAGE de las fracciones (solubles en Tris o guanidina) de la expresión de las construcciones **A)** NSP5 (27 kDa) y **B)** NSP6 (16 kDa) en pTrcHis2 B obtenidas después de la inducción. Carril 1, extractos de proteína total; carril 2, extractos de proteína solubles en Tris; carril 3, extractos de proteína solubles en guanidina (primer tratamiento); carril 4, extractos de proteína solubles en guanidina (segundo tratamiento); carril 5, fracción insoluble después de los tratamientos. Las flechas indican el tamaño de proteína esperado.

4.2.2 Expresión NSP5 y NSP6 en pTrcHis2 B / pGroES-GroEL

Debido a que el proceso de purificación se facilita al tener proteínas solubles, se utilizó un sistema de expresión en el que se co-expresan las chaperonas moleculares GroES-GroEL (Bergès y col. 1996) junto con las proteínas NSP5 y NSP6. Los resultados indican en este caso (construcciones en pTrcHis2 B de las proteínas NSP5 y NSP6) que la co-expresión no mejora la solubilidad de la proteína recombinante sobre-expresada (Figura 26 A y B, carriles 4 y 5) e incluso disminuye ligeramente su cantidad (Figura 26 A y B, carriles 3).

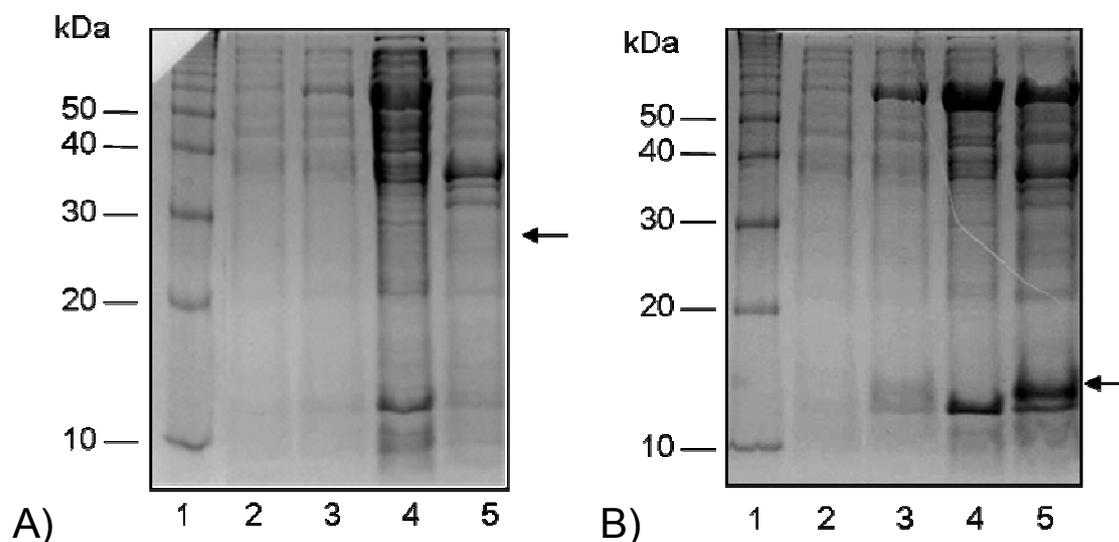


Figura 26. Análisis por SDS-PAGE de las fracciones (soluble e insoluble en Tris) de la expresión de las construcciones **A)** NSP5 (27 kDa) y **B)** NSP6 (16 kDa) en pTrcHis2 B / pGroES-GroEL. Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, extractos de proteína total antes de la inducción; carril 3, extractos de proteína total después de la inducción; carril 4, fracción soluble después de la inducción; carril 5, fracción insoluble después de la inducción. Las flechas indican el tamaño de proteína esperado.

La co-expresión de las proteínas NSP5 y NSP6 con GroES-GroEL, con respecto a la construcción en pTrcHis2 B sin chaperonas heterólogas, no tiene un efecto positivo en la concentración y solubilidad de las proteínas por lo que se decidió terminar los estudios con esta construcción y continuar con los análisis de purificación sólo con la transformante sencilla. Debido a la co-expresión, se pueden observar bandas intensas de las proteínas GroEs (aprox. 15 kDa) y de GroEL (aprox. 65 kDa) observadas en trabajos anteriores (Fayet y col. 1986) además de las bandas esperadas (Figura 23A carril 3 y B carriles 3 y 4). En algunos casos de co-expresión de proteínas recombinantes y de las chaperonas GroES-GroEL se ha observado un retardo en el crecimiento celular (Bergès y col. 1996). La sobre-expresión de chaperonas moleculares en algunos casos produce una reducción en el rendimiento total de las proteínas recombinantes posiblemente por la estabilización transitoria de formas parcialmente solubles de la

proteína que son susceptibles a degradación por proteasas celulares (Baneyx y col. 2004). En nuestro caso, la ausencia de proteína soluble recombinante indica una posible desviación de los recursos celulares hacia la expresión de las chaperonas por lo que se explica la disminución en la producción de la proteína de interés.

4.2.3 Expresión NSP5 y NSP6 en pGEX-6P-1

Las mejores condiciones de expresión usando las construcciones realizadas en el plásmido pGEX-6P-1 en la cepa BL21(DE3) pLysS de *E. coli*, se lograron en medio LB, incubación a 37°C, inducción a 0.4 mM IPTG y recuperación 2 h posteriores a la inducción (Figura 27 A y B, carriles 3).

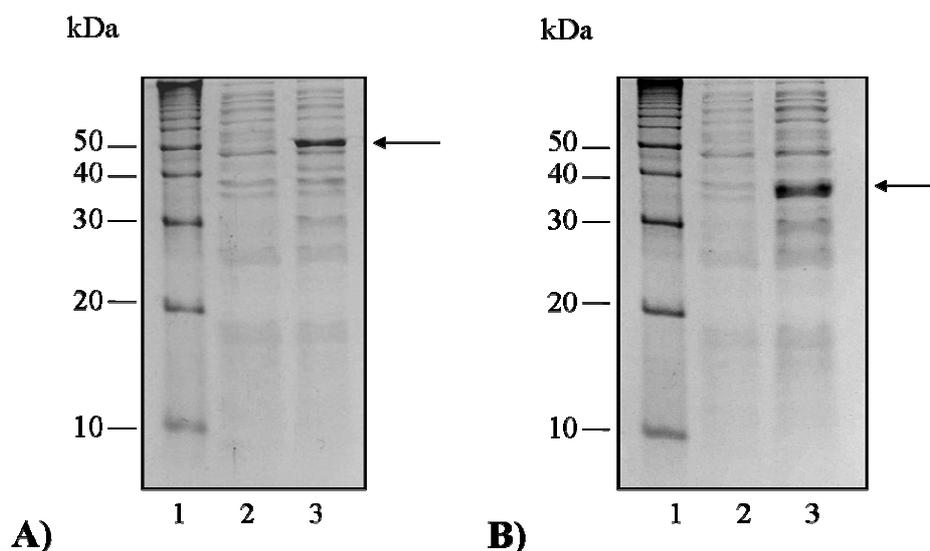


Figura 27. Análisis por SDS-PAGE de los extractos totales de la expresión de las construcciones **A)** NSP5 (54 kDa) y **B)** NSP6 (37 kDa) en pGEX-6P-1. Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, proteínas totales antes de la inducción; carril 3, proteínas totales después de la inducción. Las flechas indican el tamaño esperado de la proteína recombinante.

Para las proteínas fusionadas a GST se espera un peso molecular mayor al de la proteína nativa debido al peso molecular adicional de GST (26 kDa). Se ha reportado que la proteína GST protege a la cepa hospedera contra la toxicidad de las proteínas recombinantes en la mayoría de los casos formando cuerpos de

inclusión. En este caso, se observa un incremento en la producción de las proteínas fusionada a GST con respecto a las producidas únicamente con colas de histidina.

El análisis de la solubilidad de la proteína recombinante reveló su acumulación total en la fracción insoluble en Tris (datos no mostrados), por lo que se evaluó la solubilidad de las proteínas sobre-expresadas por el vector pGEX-6P-1 en co-transformantes que producen adicionalmente las chaperonas GroES y GroEL.

4.2.4 Expresión NSP5 y NSP6 en pGEX-6P-1 / pGroES-GroEL

Como se observa en la Figura 28, la cantidad de proteína producida por la co-transformante disminuye un poco con respecto a la sobre-expresión solo con el plásmido pGEX-6P-1 (Figura 27).

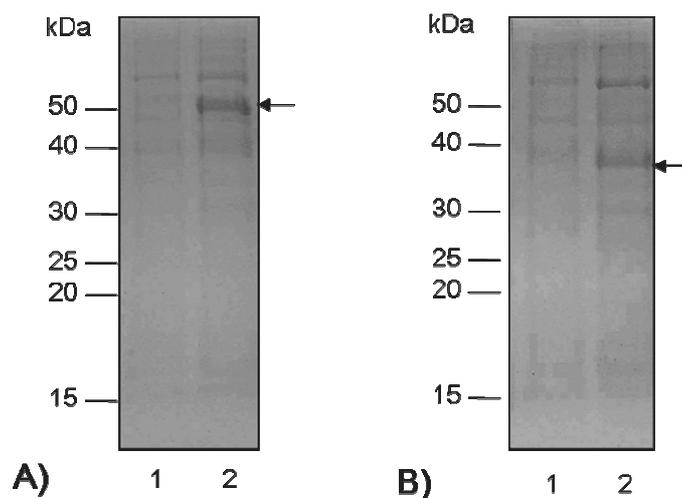


Figura 28. Análisis por SDS-PAGE de las fracciones (soluble e insoluble en Tris) de la expresión de las construcciones **A)** NSP5 (54 kDa) y **B)** NSP6 (37 kDa) en pGEX-6P-1 / pGroES-GroEL. Carril 1, extractos de proteína total antes de la inducción; carril 2, extractos de proteína total después de la inducción. Las flechas indican el tamaño de proteína esperado.

De manera adicional, se constató que la co-transformación no aumentó la cantidad de proteína soluble producida (datos no mostrados). Se decidió terminar el análisis

de la co-transformante con las chaperonas hasta esta etapa por no favorecer a los fines de mejoramiento en la solubilidad de la proteína sobre-expresada.

4.2.5 Comparación de los diferentes sistemas de expresión de las proteínas NSP5 y NSP6

La cantidad de proteína recombinante expresada por cada construcción en extractos completos de *E. coli* se comparó para determinar su eficiencia. El Molecular Imaging Software de Kodak se utilizó para el análisis de los geles de acrilamida por densitometría. Aunque se analizaron clonas con distinta producción de proteína heteróloga usando el plásmido pTrcHis2 B, la mayor producción de proteína recombinante se encontró al utilizar el vector pGEX-6P-1 (Tabla 6).

Tabla 6. Comparación de la expresión de las proteínas NSP5 y NSP6 entre vectores

Clave	Inserto	Plásmido	Cepa	Proteína (%) ^a	Proteína soluble
5T	NSP5	pTrcHis2 B	TOP10	2	NO
6T	NSP6	pTrcHis2 B	TOP10	11	NO
5T ^b	NSP5	pTrcHis2 B	TOP10	4	SI
6T ^b	NSP6	pTrcHis2 B	TOP10	14	SI
5TG	NSP5	pTrcHis2 B / pGroES-GroEL	TOP10	0.3	NO
6TG	NSP6	pTrcHis2 B / pGroES-GroEL	TOP10	8	NO
5G	NSP5	pGEX-6P-1	BL21(DE3)pLysS	34	NO
6G	NSP6	pGEX-6P-1	BL21(DE3)pLysS	31	NO
5GG	NSP5	pGEX-6P-1 / pGroES-GroEL	BL21(DE3)	25	NO
6GG	NSP6	pGEX-6P-1 / pGroES-GroEL	BL21(DE3)	22	NO

^a Porcentaje de proteína recombinante estimada en extractos totales por análisis de densitometría en SDS-PAGE. ^b Clonas analizadas en un segundo escrutinio para la construcción pTrcHis2 B.

La cantidad de proteína NSP5 producida en el vector pGEX-6P-1 fue más de 8 veces mayor que la producida en el segundo escrutinio de clonas en el vector pTrcHis2 B (Tabla 6). En el caso de la proteína NSP6, la cantidad de proteína producida en pGEX-6P-1 fue de más del doble que en pTrcHis2 B. Este hecho podría explicarse debido a que la proteína GST fusionada a las proteínas de interés favorece la formación de cuerpos de inclusión y por consecuencia, permite la expresión continua de proteína recombinante sin comprometer la viabilidad de *Escherichia coli*.

En algunos casos (pro-colagenasa citoplasmática) las chaperonas GroE sobre-expresadas favorecen la acumulación y solubilidad de las proteínas recombinantes en *Escherichia coli*, pero en otros no producen un efecto significativo (cloramfenicol acetiltransferasa, N-miristoil transferasa de levadura). La determinación del comportamiento de una proteína específica ante chaperonas sobre-expresadas debe realizarse empíricamente (Lee y Olins 1992). La inclusión de las chaperonas GroES y GroEL en todos los casos analizados en esta tesis produjo una reducción de la cantidad de proteína recombinante (Tabla 6) quizás debido a la desviación de recursos de la cepa para la producción de las chaperonas antes dedicados para la sobre-expresión.

Con base en estos resultados, se decidió continuar con la determinación de las condiciones de purificación solo para las clonas encontradas en el segundo escrutinio de las construcciones pTrcHis2 y con las transformantes en pGEX-6P-1.

Adicionalmente, se realizó un análisis de la presencia de expresión de proteína soluble encontrándose resultados positivos solo para el caso de las clonas en pTrcHis2 B analizadas en el segundo escrutinio (Tabla 6).

4.3 PURIFICACIÓN

4.3.1 Purificación de la expresión NSP5 y NSP6 en pTrcHis2 B

Para la purificación de las proteínas recombinantes producidas en el vector pTrcHis2 B se siguió inicialmente el protocolo propuesto por el fabricante sobre el cual se hicieron las modificaciones que permitieron una recuperación más eficiente (tiempos de incubación mayores, mayor número de lavados y aumento en la concentración de algunos componentes de las soluciones). Una vez estandarizado el protocolo, se obtuvieron las proteínas con una pureza de aproximadamente 84 y 97% para NSP5 y NSP6, respectivamente (Figura 29 A y B). La proteína obtenida en cada caso se cuantificó y se obtuvieron valores de 8.7 mg / L para NSP5 y de 9.5 mg / L para NSP6. Las cantidades y la pureza de las proteínas recombinantes obtenidas al final del proceso fueron adecuadas para realizar análisis posteriores de actividad y cristalización.

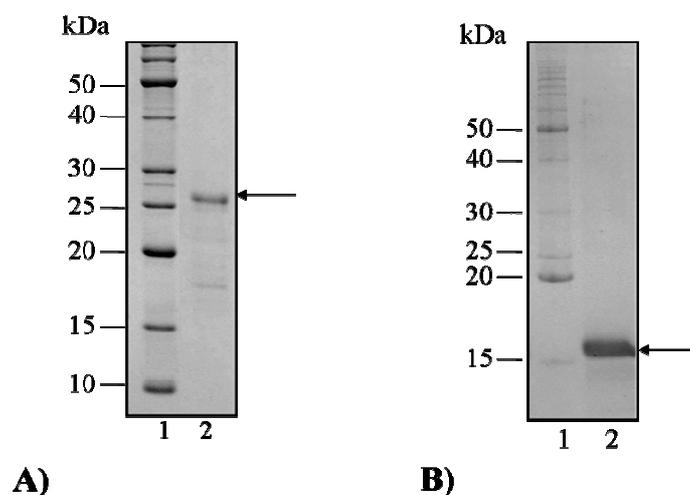


Figura 29. Purificación de las proteínas recombinantes **A)** NSP5 (27 kDa) y **B)** NSP6 (16 kDa) producidas en pTrcHis2 B por cromatografía de afinidad a metal. Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, proteína purificada. Las flechas indican el peso molecular la proteína esperada.

Posteriormente, para confirmar la naturaleza de las proteínas expresadas en las construcciones pTrcHis2 B, se realizó un Western blot anti-histidinas, teniéndose resultados positivos para ambas proteínas (Figura 30 A y B).

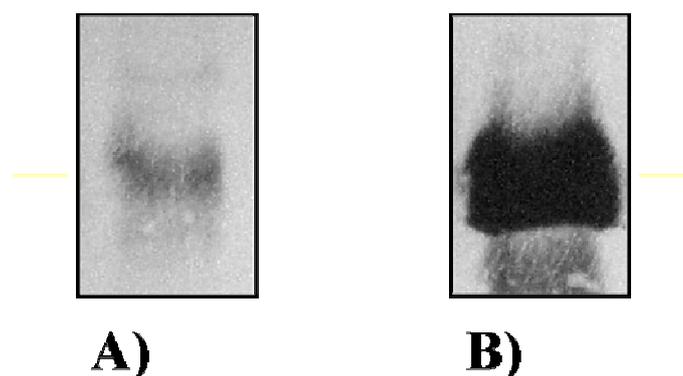


Figura 30. Análisis Western blot de las proteínas recombinantes puras **A)** NSP5 y **B)** NSP6 producidas en pTrcHis2 B. Se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-His anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina (QIAGEN).

4.3.2 Purificación de la expresión NSP5 y NSP6 en pGEX-6P-1

Se ha reportado que el vector pGEX-6P-1 permite la expresión de las proteínas de interés fusionadas a la proteína GST, por lo que pueden purificarse con más de 90% de pureza bajo condiciones suaves (10 mM glutathione) mediante cromatografía de afinidad usando la resina Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare). El uso de la enzima PreScission Protease (GE Healthcare) permite la separación de GST de la proteína de interés. La enzima PreScission Protease (46 kDa) es una fusión entre GST y la proteasa 3C de rinovirus humano. La proteasa reconoce la secuencia Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln¹Gly-Pro. Debido a su fusión con GST, la proteasa puede removerse utilizando la resina Glutathione Sepharose 4B.

En nuestro caso y según el protocolo descrito en Materiales y Métodos no fue posible realizar la purificación de las proteínas fusionadas a GST. En ambos casos (NSP5 y NSP6), las proteínas se unieron a la resina de manera específica pero no se logró su liberación de la misma (datos no mostrados). Este hecho pone de manifiesto la necesidad de mejorar el protocolo de purificación ya sea aumentando la concentración de glutathione (reactivo de mayor afinidad por GST que la resina) o el tiempo de incubación.

4.3.3 Comparación de la purificación NSP5 y NSP6 entre los distintos vectores

Para obtener una estimación de la eficiencia del proceso de purificación, se cuantificó la proteína recuperada en cada lote y se comparó con la cantidad inicial estimada de proteína recombinante total. El porcentaje de pureza de la proteína recuperada se determinó por densitometría (Tabla 7). Estos datos nos indican que en el caso de la expresión en pTrcHis2 B el proceso fue exitoso y es capaz de cubrir los requerimientos necesarios para la realización de análisis posteriores de actividad y cristalización. La proteína expresada en pGEX-6P-1 produjo una mayor cantidad de proteína recombinante con respecto a pTrcHis2 B, sin embargo, no pudo ser purificada por lo que no se utilizó en los análisis posteriores.

Tabla 7. Comparación de la eficiencia de purificación entre los sistemas usados para la expresión de las proteínas NSP5 y NSP6.

Clave	Inserto	Plásmido	Proteína recuperada (%) ^a	Pureza (%) ^b
5T	NSP5	pTrcHis2 B	30	84
6T	NSP6	pTrcHis2 B	22	97
5G	NSP5	pGEX-6P-1	-	-
6G	NSP6	pGEX-6P-1	-	-

^a Porcentaje de proteína purificada (determinada por cuantificación) en comparación con la proteína recombinante estimada en extractos totales (determinada por cuantificación y densitometría). ^b Porcentaje de pureza de la proteína recombinante al final del proceso determinada en SDS-PAGE por densitometría.

Con los datos mostrados hasta este punto de la tesis, se publicó el artículo titulado “Expression and purification of rotavirus proteins NSP5 and NSP6 in *Escherichia coli*”.

ORIGINAL ARTICLE

Expression and Purification of Rotavirus Proteins NSP5 and NSP6 in *Escherichia coli*

M. Samaniego-Hernández,¹ A. De León-Rodríguez,¹ R. Aparicio-Fabre,¹
C. Arias-Ortiz,² and A. P. Barba de la Rosa^{1,*}

¹Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, Depto Biología Molecular, San Luis Potosí, SLP, México; and

²Instituto de Biotecnología-UNAM, Depto Genética y Fisiología Molecular, Cuernavaca, Mor, México

Abstract

Rotaviruses are one of the worldwide leading causes of gastroenteritis in children under 5 yr old. The rotavirus nonstructural NSP5 is a phosphoprotein implicated in viroplasm formation, whereas NSP6 could have a possible regulatory role of NSP5. It has been reported that N- and C-termini of NSP5 are important for their function. However, no structural information on NSP5 and NSP6 proteins is available. Because a high amount of protein is required for structural analysis, efficient expression systems are required. His-tag fusion at the C-terminus and glutathione-S-transferase (GST)-fusion at the N-terminus were used as expression systems, and conditions for recombinant proteins expression were obtained. His-tag fusion was not efficient to produce NSP5 (2% of total protein), but NSP6 was expressed in higher amounts (11% of total protein). In contrast, GST-NSP5 and GST-NSP6 proteins correspond to 34 and 31% of the total proteins, respectively. GST-fusions seem to have a protective effect against nonstructural rotavirus protein toxicity in *Escherichia coli*; however, in both systems, NSP5 and NSP6 recombinant proteins were expressed as inclusion bodies. Conditions for solubilization and purification of recombinant proteins were achieved. This is the first report of expression and purification of NSP5 and NSP6 recombinant proteins in suitable amounts for further structural analysis.

Index Entries: Rotavirus; NSP5; NSP6; expression; inclusion bodies; purification.

INTRODUCTION

Rotaviruses are the main etiologic agents of viral gastroenteritis in children under 5 yr old, they belong to the family *Reoviridae* and contain 11 double-stranded RNAs encoding six structural (VP1-VP4, VP6, and VP7) and six nonstructural proteins (NSP1-NSP6) (1-3). NSP1-6 are present in rotavirus-infected cells but not in virions (4-6). The nonstructural rotavirus proteins are synthesized in the cell cytoplasm during infection and have functions related with the synthesis control of viral proteins, genome replication, viral genes packaging, and viral particle maturing inside the cell. However, the roles of each NSP protein in pathogenesis and immune

response in rotavirus infections have not been completely defined. NSP4 acts as a viral enterotoxin, causing Ca²⁺-dependent transepithelial chloride secretion in young mice and human intestinal cells (7-9). The structure of the cytoplasmic domain of NSP4 from rotavirus strain SA11 has been investigated by using limited proteolysis and mass spectrometry (10). NSP2, NSP5, and NSP6 accumulate in viroplasms, and the expression of NSP2 and NSP5 together, but not separately, generates viroplasm-like structures in uninfected cells (5). NSP2 has strong sequence-independent affinity for single-stranded RNA (ssRNA), interacts with the viral RNA polymerase, and self-assembles into stable octamers. The NSP2 octamers have Mg²⁺-dependent nucleoside 5'-triphosphate (NTPase) activity and Mg²⁺-independent helix-destabilizing activity. During hydrolysis of NTP by NSP2, the protein undergoes phosphorylation

* Author to whom all correspondence and reprint requests should be addressed. E-mail: apbarba@ipicyt.edu.mx

4.4 ANÁLISIS DE ACTIVIDAD

4.4.1 Ensayos de actividad ATPasa

Las proteínas NSP5 y NSP6 purificadas se utilizaron para realizar los análisis de actividad ATPasa. Se preparó una curva estándar de 1 a 8 nmol de KH_2PO_4 (Tabla A3) que relaciona la absorbancia detectada con la cantidad de fosfato inorgánico liberado en la reacción (Figura 31).

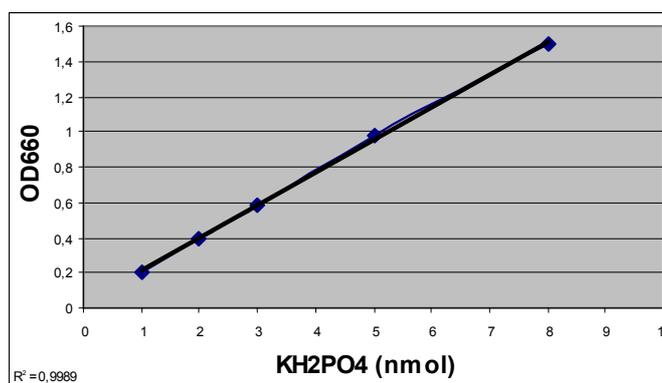


Figura 31. Curva estándar de KH_2PO_4 .

Se determinaron las concentraciones de NSP5 y NSP6 adecuadas para la liberación de fosfato inorgánico en valores ubicados dentro de la curva estándar a las condiciones de pH 7.0 a 37°C . Para NSP5 se determinó que $1\ \mu\text{g}$ de proteína es necesario para detectar actividad mientras que para NSP6 con $100\ \text{ng}$ fue suficiente (Figura 32).

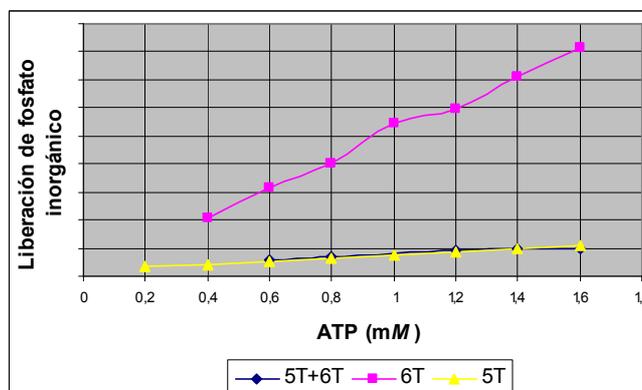


Figura 32. Ensayos de actividad ATPasa de las proteínas purificadas NSP5 y NSP6.

Ambas proteínas presentan actividad ATPasa y en ambos casos dicha actividad aumenta proporcionalmente a la concentración de ATP presente. La proteína NSP6 presenta una actividad mucho mayor que NSP5. En un análisis de actividad de las dos proteínas mezcladas se observó un comportamiento prácticamente idéntico al observado para la proteína NSP5, lo que parece indicar que la proteína NSP5 bloquea la actividad de la proteína NSP6.

La actividad ATPasa de la proteína NSP6 se analizó en buffer de pH 7.0 a 37°C con 0.5 mM ATP y se monitoreó durante 40 min (Figura 33).

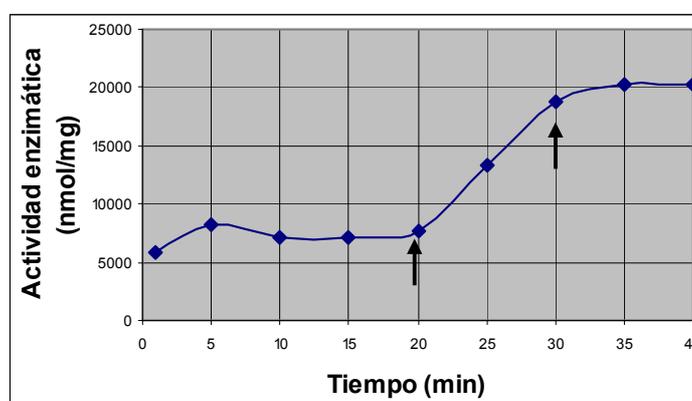


Figura 33. Ensayo de actividad ATPasa de la proteína purificada NSP6. Las flechas delimitan los valores utilizados para la determinación del cálculo de la velocidad inicial.

La actividad ATPasa de NSP6 siguió una cinética tipo Michaelis-Menten. La velocidad inicial de reacción observada fue de 1,097 nmol/mg-min (Figura 33, flechas).

Para determinar el pH óptimo de la actividad ATPasa de NSP6, se realizó un análisis de actividad a 37°C con 1 mM de ATP durante 45 min en un intervalo de pH de 3.0 a 7.0. La actividad ATPasa de la proteína NSP6 se favoreció a valores de pH ácidos (Figura 34).

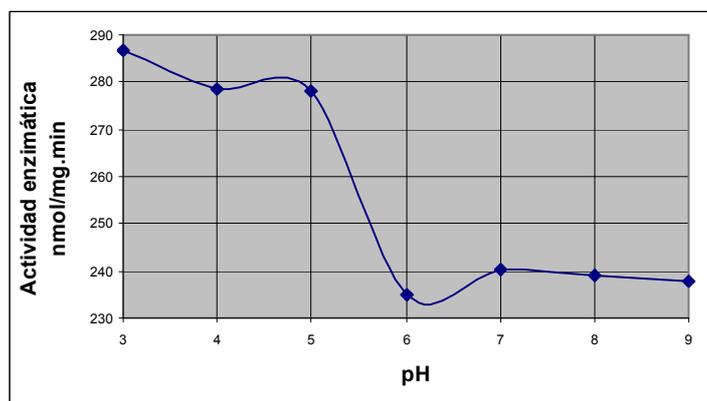


Figura 34. Ensayo de actividad ATPasa de la proteína purificada NSP6 en un rango de pH de 3.0 a 7.0.

Estos resultados indican que las proteínas NSP5 y NSP6 de rotavirus presentan actividad ATPasa. Los valores de actividad ATPasa determinados para la proteína NSP6 se encuentran entre los valores reportados de actividad para otras proteínas (Tabla 8).

Tabla 8. Velocidad máxima de actividad ATPasa de varias proteínas (Santos 2002)

PROTEÍNA	Vmax pmol Pi/mg/min
Ta TAA43	61
Ta VAT	558
CHO NSF	67
Re ARC	268
Sc CDC48	1560
Ec FtsH	459X10 ³

4.4.2 Ensayo de actividad ATPasa en gel

Para determinar si la actividad ATPasa observada corresponde únicamente a la proteína recombinante y no a las trazas de proteínas co-purificadas que se observan en geles teñidos con Coomassie, se realizaron ensayos de actividad ATPasa en geles nativos de agarosa con duplicados teñidos con Coomassie,

encontrándose que solo la proteína recombinante es la responsable de la actividad (Figura 35).

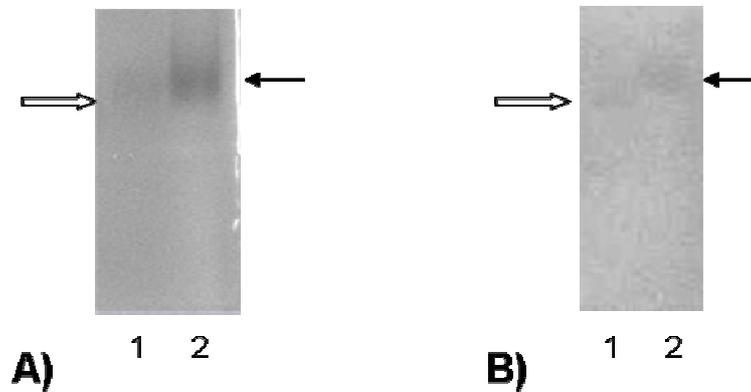


Figura 35. Análisis de la actividad ATPasa en geles de agarosa de las proteínas NSP5 y NSP6 expresadas en pTrcHis2 B. **A)** Tinción con Coomassie; carril 1: Proteína purificada NSP5, Carril 2: Proteína purificada NSP6. **B)** Análisis de actividad en gel; carril 1: Proteína purificada NSP5, Carril 2: Proteína purificada NSP6. Las flechas huecas indican la proteína NSP5. Las flechas negras indican la proteína NSP6.

4.5 CRISTALIZACIÓN

La formulación de matriz poco densa de los kits permite un análisis eficiente de un amplio espectro de sales, polímeros y solventes orgánicos en una amplia variedad de valores de pH. Cuando se obtienen cristales, la información obtenida puede utilizarse para optimizar las condiciones de cristalización para producir cristales adecuados para análisis de difracción por rayos X. En caso de que no se obtengan cristales en monitoreos iniciales, la información de solubilidad obtenida en el ensayo puede usarse para desarrollar estrategias para análisis posteriores (McPherson 1999).

Se realizaron escrutinios preliminares de cristalización de las proteínas purificadas NSP5 y NSP6 usando los kits Crystal Screen™ 1 y 2 (Hampton Research). Se obtuvieron microcristales a condiciones de 0.01 M Cloruro de níquel, 0.1 M Tris pH 8.5, 1.0 M sulfato de litio (Figura 36). A partir de estas condiciones obtenidas se continuará con los experimentos de cristalización hasta obtener cristales de tamaño adecuado para los estudios de difracción por rayos X.

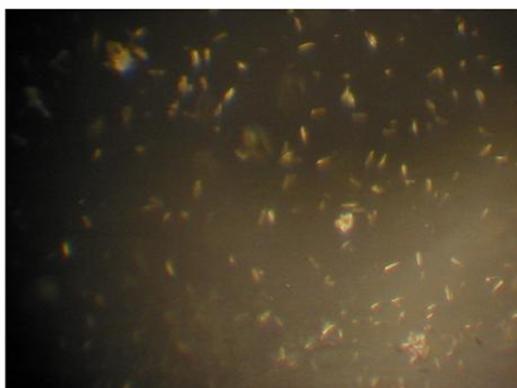


Figura 36. Micro-cristales obtenidos con la proteína purificada NSP5 producida en la construcción pTrcHis2 B.

5. CONCLUSIONES

Los rotavirus son un problema importante de salud pública y debido a la variabilidad de cepas, las vacunas actuales proveen protección completa sólo contra las cepas utilizadas en su elaboración. Se ha descrito que una alternativa más robusta para el control de la infección es el diseño de fármacos dirigidos hacia las proteínas no estructurales (NSP's), proteínas que son más conservadas. Dentro de las NSP's, las proteínas NSP5 y NSP6 son las que se han descrito tener un papel central en la replicación de los rotavirus, ambas están implicadas en las primeras etapas del ciclo de infección y sus estructuras no se han podido determinar, principalmente por la falta de sistemas de sobre-expresión que generen cantidades suficientes para llevar a cabo los estudios de cristalización. En este trabajo, las proteínas de rotavirus NSP5 y NSP6 se expresaron en los vectores de clonación pTrcHis2 B y pGEX-6P-1 en *Escherichia coli*. La mayor cantidad de producción en extractos totales de proteína se obtuvo al utilizar el plásmido pGEX-6P-1. La purificación sólo se logró en el caso de la construcción pTrcHis2 B con una recuperación del 30 y 22% de la proteína recombinante total producida, con una pureza del 84 y 97% para NSP5 y NSP6 respectivamente. Las proteínas purificadas NSP5 y NSP6 de rotavirus presentaron actividad ATPasa reportada por primera vez en este trabajo. Las condiciones para la formación de microcristales se determinaron para las proteínas purificadas NSP5 y NSP6 producidas en pTrcHis2 B. Las proteínas recombinantes NSP5 y NSP6 de rotavirus obtenidas en este trabajo cubren los requerimientos para la realización de estudios cristalográficos que eventualmente permitirán la determinación de la estructura tridimensional de ambas proteínas.

6. REFERENCIAS

1. **Afrikanova I, Fabbretti E, Miozzo MC, Burrone OR.** (1998) Rotavirus NSP5 phosphorylation is up-regulated by interaction with NSP2. *J Gen Virol*, **79**:2679-2686.
2. **Amersham Biosciences.** (2001) En: Protein purification handbook. Edition AC.
3. **Amersham Biosciences.** (2001) En: The recombinant protein handbook, protein amplification and simple purification. Edition AB.
4. **Amersham Biosciences.** (2002) En: Affinity chromatography, principles and methods. Edition AD.
5. **Amersham Biosciences.** (2002) En: GST gene fusion system handbook. Edition AA.
6. **Amersham Pharmacia Biotech.** (1997) En: GST gene fusion system. 3rd edition, revision 2.
7. **Anderson EJ, Weber SG.** (2004) Rotavirus infection in adults. *Lancet Infect Dis*, **4**:91-99.
8. **Arias CF, Dector MA, Segovia L, López T, Camacho M, Isa P, Espinoza R, López S.** (2004) RNA silencing of rotavirus gene expression. *Virus Research*, **102**:43-51.
9. **Baneyx F, Mujacic M.** (2004) Recombinant protein holding and misfolding in Escherichia coli. *Nat Biotechnol*, **22**(11):1399-1408.
10. **Bergès H, Joseph-Liauzun E, Fayet O.** (1996) Combined effects of the signal sequence and the major chaperone proteins on the export of human cytokines in Escherichia coli. *Appl Environ Microbiol*, **62**(1):55-60.
11. **Berois M, Sapin C, Erk I, Poncet D, Cohen J.** (2003) Rotavirus nonstructural protein NSP5 interacts with major core protein VP2. *J Virol*, **77**(3):1757-1763.
12. **Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ.** (1973) Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *The Lancet*, **8**:1281-1283.
13. **Chnaiderman J, Barro M, Spencer E.** (2002) NSP5 phosphorylation regulates the fate of viral ARNm in rotavirus infected cells. *Arch Virol*, **147**(10):1899-1911.
14. **Cook JP, McCrae MA.** (2004) Sequence analysis of the guanylyltransferase (VP3) of group A rotaviruses. *J Gen Virol*, **85**:929-932.

-
15. **Cunliffe NA, Bresee JS, Hart CA.** (2002) Rotavirus vaccines: Development, current issues and future prospects. *J Infection*, **45**:1-9.
 16. **Davidson College.** (2003) Department of biology, Davidson, NC. <http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2003/Kogoy/pr otein.html> (Acceso: 1 Diciembre 2006)
 17. **De León A, Jiménez-Islas H, González-Cuevas M, Barba de la Rosa AP.** (2004) Analysis of the expression of the *Trichoderma harzianum ech42* gene in two isogenic clones of *Escherichia coli* by surface response methodology. *Process Biochem*, **39**:2173-2178.
 18. **Dennehy PH.** (2005) Rotavirus vaccines: an update. *Curr Opin Pediatr*, **17**:88-92.
 19. **Eichelberg K, Ginocchio CC, Galán JE.** (1994) Molecular and functional characterization of the *Salmonella typhimurium* invasion genes *invB* and *invC*: Homology of InvC to the F₀F₁ ATPase family of proteins. *J Bacteriol*, **176**(15):4501-4510.
 20. **Estes MK.** (1996) Advances in molecular biology: impact on rotavirus vaccine development. *J Infect Dis*, **174**:S37–S46.
 21. **Fabbretti E, Afrikanova I, Vascotto F, Burrone OR.** (1999) Two non-structural rotavirus proteins, NSP2 and NSP5, form viroplasm-like structures *in vivo*. *J of Gen Virol*, **80**:333-339.
 22. **Fan F, Macnab RM.** (1996) Enzymatic characterization of FliI. *J Biol Chem*, **271**(50):31981-31988.
 23. **Fayet O, Louarn JM, Georgopoulos C.** (1986) Supression of the *Escherichia coli dnaA46* mutation by amplification of the *groES* and *groEL* genes. *Mol Gen Genet*, **202**:435-445.
 24. **Food and Drug Administration (U.S.)** Rotavirus. En: Bad bug book. (Acceso: 16 Noviembre 2006) <http://www.cfsan.fda.gov/~mow/chap33.html>
 25. **Glass RI, Parashar UD, Bresee JS, Turcios R, Fischer TK, Widdowson MA, Jiang B, Gentsch JR.** (2006) Rotavirus vaccines: current prospects and future challenges. *Lancet*, **368**:323-32.
 26. **Golantsova NE, Gorbunova EE, Mackow ER.** (2004) Discrete domains within the rotavirus VP5* direct peripheral membrane association and membrane permeability. *J Virol*, **78**(4):2037-2044.
 27. **Goulding CW, Perry LJ.** (2003) Protein production in *Escherichia coli* for structural studies by X-ray crystallography. *J Structural Biol*, **142**:133-143.
-

-
-
28. **Gouvea V, Brantly M.** (1995) Is rotavirus a population of reassortants? *Trends Microbiol*, **3**:159-162.
 29. **Graff JW, Mitzel DN, Weisend CM, Flenniken ML, Hardy ME.** (2002) Interferon regulatory factor 3 is a cellular partner of rotavirus NSP1. *J Virol*, **76**(18):9545-9550.
 30. **Hampton Research Corp.** Crystal Growth 101 Literature. (Acceso: 16 Noviembre 2006) <http://www.hamptonresearch.com/support/Growth101Lit.aspx>
 31. **Hoshino Y, Wyatt RG, Greenberg HB, Flores J, Kapikian AZ.** (1984) Serotypic similarity and diversity of rotaviruses of mammalian and avian origin as studied by plaque-reduction neutralization. *J Infect Dis*. **149**:694-702.
 32. **Invitrogen, Life Technologies.** pTrcHis2 A, B, and C. Vectors for expression of recombinant proteins containing C-terminal 6xHis tags in *E. coli*. Version E.
 33. **Iturriza-Gómara M, Isherwood B, Desselberger U, Gray J.** (2001) Reassortment *in vivo*: driving force for diversity of human rotavirus strains isolated in the United Kingdom between 1995 and 1999. *J Virol*, **75**(8):3696-3705.
 34. **Iturriza-Gomara M, Anderton E, Kang G, Gallimore C, Phillips W, Desselberg U, Gray J.** (2003) Evidence for genetic linkage between the gene segments encoding NSP4 and VP6 proteins in common and reassortant human rotavirus strains. *J Clin Microbiol*, **41**(8):3566-3573.
 35. **Kim R, Yokota H, Kim SH.** (2000) Electrophoresis of proteins and protein-protein complexes in a native agarose gel. *Anal Biochem*, **282**:147-149.
 36. **Kojima K, Taniguchi K, Urasawa T, Urasawa S.** (1996) Sequence analysis of normal and rearranged NSP5 genes from human rotavirus strains isolated in nature: implications for the occurrence of the rearrangement at the step of plus strand synthesis. *Virology*, **224**(2):446-52.
 37. **Kombo LA, Gerber MA, Pickering LK, Atreya CD, Breiman RF.** (2001) Intussusception, infection, and immunization: Summary of a workshop on rotavirus. *Pediatrics*. **108**(2):37.
 38. **Krstulovic AM.** (1982) Basic theory and terminology. En: Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography, pp. 4-31. John Wiley and Sons.
 39. **Lee SC, Olins PO.** (1992) Effect of overproduction of heat shock chaperones GroESL and DnaK on human procollagenase production in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **267**(5):2849-2852.
-
-

-
-
40. **López S, Arias CF.** (1993) Protein NS26 is highly conserved among porcine rotavirus strains. *Nucleic Acids Res*, **21**(4):1042.
 41. **López S, Arias CF.** Los rotavirus. En: Martínez Romero E, Martínez Romero JC (eds.). Microbios en línea. DGSCA UNAM. (Acceso: 16 Noviembre 2006) <http://www.biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/Cap17/>
 42. **McPherson, A.** (1999) Procedures for macromolecular crystallization. En: Crystallization of biological macromolecules. Cold Spring Harbor Press, New York. 173-187.
 43. **Midthun K, Kapikian AZ.** (1996) Rotavirus vaccines: an overview. *Clin Microbiol Rev*, **9**(3):423-434.
 44. **Mohan KVK, Muller J, Atreya CD.** (2003) The N- and C-terminal regions of rotavirus NSP5 are the critical determinants for the formation of viroplasm-like structures independent of NSP2. *J Virol*, **77**(22):12184-12192.
 45. **Nester EW, Anderson DG, Roberts CE, Nester MT.** (2001) En: Microbiology: A human perspective, 3rd ed, Mc Graw Hill.
 46. **Organización Panamericana de la Salud.** (2003) Reunión regional sobre la implementación de la vigilancia epidemiológica de rotavirus. Informe final. PAHO/FCH/IM/2003-00005.
 47. **Padilla-Noriega L, Paniagua O, Guzmán-León S.** (2002) Rotavirus protein NSP3 shuts off host cell protein synthesis. *Viol*, **298**:1-7.
 48. **Parashar UD, Bresee JS, Gentsch JR, Glass RI.** (1998) Rotavirus. *Emerging Infectious Dis*, **4**(4):561-570.
 49. **Parashar UD, Hummelman EG, Breese JS, Miller MA, Glass RI.** (2003) Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerging Infectious Dis*, **9**(5):565-572.
 50. **Parashar UD, Gibson CJ, Bresee JS, Glass RI.** (2006) Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerging Infectious Dis*, **12**(2):304-306.
 51. **Rotavirus vaccine program.** Rotavirus vaccine. (Acceso: 16 Noviembre 2006) <http://www.rotavirusvaccine.org/vaccine-facts.htm>
 52. **Santos Martínez ML.** (2002) Genome sequencing of thermoplasma acidophilum and characterization of the translation-associated ATPase of 43 kDa (TAA43), a member of the AAA+ family. Tesis Doctoral. Instituto Max Planck de Bioquímica en Martinsried.
-
-

-
-
53. **Santos L, Frickey T, Peters J, Baumeister W, Lupas A, Zwickl P.** (2004) *Thermoplasma acidophilum* TAA43 is an archaeal member of the eukaryotic meiotic branch of AAA ATPases. *Biol Chem*, **385**:1105–1111.
54. **Santos N, Hoshino Y.** (2005) Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev Med Virol*, **15**:29-56.
55. **Torres-Vega MA.** (2000) Estudio sobre las asociaciones intermoleculares de la proteína NSP5 de los rotavirus. Tesis Doctoral. Departamento de Genética y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.
56. **Torres-Vega MA, González RA, Duarte M, Poncet D, López S, Arias CF.** (2000) The C-terminal domain of rotavirus NSP5 is essential for its multimerization, hyperphosphorylation and interaction with NSP6. *J Gen Virol*, **81**:821-830.
57. **Varani G, Allain FHT.** (2002) How a rotavirus hijacks the human protein synthesis machinery. *Nature Structural Biol*, **9**(3):158-160.
58. **Vende P, Taraporewala ZF, Patton JT.** (2002) RNA-binding activity of the rotavirus phosphoprotein NSP5 includes affinity for double-stranded RNA. *J Virol*, **76**(10):5291-5299.
59. **Vieira HLA, Estevas C, Roldao A, Peixoto CC, Sousa MFQ, Cruz PE, Carrondo MJT, Alves PM.** (2005) Triple layered rotavirus VLP production: Kinetics of vector replication, mRNA stability and recombinant protein production. *J Biotechnol*, **120**:72-82.
60. **Walter S.** (2002) Structure and function of the GroE chaperone. *Cell Mol Life Sci*. **59**:1589-1597.
61. **Walter S, Buchner J.** (2002) Molecular chaperones - Cellular machines for protein folding. *Angew Chem Int Ed*, **41**(7):1098-1113.

7. ANEXOS

7.1 REACTIVOS

<u>REACTIVO</u>	<u>PROVEEDOR</u>
Acetato de potasio (KAc)	Ctr Scientific
Acetato de sodio (Sodium acetate anhydrous)	Sigma
Ácido acético glacial	Karal
Ácido clorhídrico (HCl)	Ctr Scientific
Acrilamida (30% acrylamide/Bis solution, 29:1)	Bio-Rad
Agar	Gibco
Agarosa	Gibco
ATP (Adenosine 5'-Triphosphate, disodium salt hydrate)	GE Healthcare
Azul de bromofenol	Sigma
BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate)	Ge Healthcare
Bromuro de etidio (BrEt)	Sigma
BSA (Bovine serum albumin)	Sigma
Buffer carga ADN (TrackIt Cyan/Yellow Loading Buffer)	Invitrogen
Buffer PCR 10X	Invitrogen
Citrato de sodio (Sodium citrate tribasic dihydrate)	Sigma
Cloroformo	Ctr Scientific
Cloruro de calcio (CaCl ₂)	Karal
Cloruro de magnesio	Sigma
Cloruro de manganeso (MnCl ₄ ·H ₂ O)	Sigma
Cloruro de potasio (KCl)	Sigma
Cloruro de rubidio (RbCl)	Aldrich
Cloruro de sodio (NaCl)	Sigma
Coomassie (Coomassie Brilliant Blue G-250)	USB
dNTPs 10 mM	Invitrogen
EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)	Sigma
Etanol	Ctr Scientific

<u>REACTIVO</u>	<u>PROVEEDOR</u>
Fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1 v/v)	Invitrogen
Fosfato de sodio monobásico (NaH ₂ PO ₄)	Kem
Fosfato de sodio dibásico (Na ₂ HPO ₄)	Kem
Fosfato de potasio monobásico (KH ₂ PO ₄)	Kem
Fosfato de potasio dibásico (K ₂ HPO ₄)	Kem
Glicerol	Research Organics
Glicina	Bio-Rad
Glucosa (Dextrose)	Invitrogen
Guanidina (Guanidine hydrochloride)	Invitrogen
HEPES	Research Organics
Hidróxido de sodio (NaOH)	Karal
Imidazol (1,3-Diaza-2,4-cyclopentadiene)	Sigma
Isopropanol	Karal
LB (Lennox L Broth Base)	Invitrogen
L-Cisteína (L-Cysteine hydrochloride monohydrate)	Sigma
Mercaptoetanol (2-ME)	Bio-Rad
MES (2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid)	Research Organics
Metanol	Karal
MgCl ₂ 50 mM (grado PCR)	Invitrogen
Molibdato de amonio (ammonium molybdate tetrahydrate)	Sigma
MOPS (3-[N-Morpholino]propanesulfonic acid)	Gibco
NBT (nitroblue tetrazolium)	Ge Healthcare
Persulfato de amonio (PSA)	Prod Quím Mty
Ponceau S	Sigma
Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad
SDS (Sodium dodecyl sulfate)	Bio-Rad
TEMED (N,N,N',N'-Tetra-methylethylenediamine)	Bio-Rad
Tricina (N-[Tris(hidroxymethyl)methyl]glycine)	Bio-Rad
Tricine sample buffer	Bio-Rad

<u>REACTIVO</u>	<u>PROVEEDOR</u>
Tris	Invitrogen
Tritón X-100 (Polyethylene glycol tert-octylphenyl ether)	Research Organics
Tween 20 (Polyoxyethylene sorbitan monolaurate)	Bio-Rad
Urea	Bio-Rad
Verde malaquita (Malaquite green carbinol hydrochloride)	Aldrich

7.2 EQUIPO

<u>EQUIPO</u>	<u>MODELO</u>	<u>PROVEEDOR</u>
Autoclave	Sterilizer SES10	Yamato
Balanza analítica	HM-120	A&D Weighing
Cámara horizontal de electroforesis	MINI-SUB CELL GT	Bio-Rad
Cámara vertical de electroforesis	MINI-PROTEAN 3 Cell	Bio-Rad
Cámara de transferencia a membranas	Trans-Blot semi-dry transfer cell	Bio-Rad
Campana de flujo laminar horizontal	Línea Alder 2000 CFH-13	Fisher Alder
Campana de extracción de humos	Línea Alder 2000 CS-15	Fisher Alder
Centrifuga	SORVALL Super T21	Kendro
Destilador y desionizador de agua	Elix5 y MilliQ academic	Millipore
Espectrofotómetro	UV-Visible ChemStation	Agilent
Fotodocumentador	Gel Logic 100 Imaging System	Kodak
Fuente de poder	Power Pac 3000	Bio-Rad
Incubadora	IRO-65	Lúmina

<u>EQUIPO</u>	<u>MODELO</u>	<u>PROVEEDOR</u>
Liofilizadora	FreeZone6	Labconco
Minicentrífuga	Biofuge fresco	Kendro
Placa de agitación / calentamiento	Stirrer/Hot plate	Corning
Potenciómetro	UB-5 pHmeter UltraBASIC	Denver Instrument
Sonicador	High Intensity Ultrasonic processor Model CV33	Autotune Series
Shaker	Rocking platform	Daigger
Termoblock	DIGI-BLOCK™ Jr.	Laboratory Devices
Termociclador	GeneAmp PCR System 2400	Perkin Elmer
Termomixer	Thermomixer	Eppendorf
Transiluminador	MacroVue UV-20	Hoefer
Ultracongelador	-86°C Ultralow freezer	Nuaire
Vortex	Fisher Vortex Genie 2	Fisher Scientific

7.3 CEPAS BACTERIANAS

<u>CEPA</u>	<u>GENOTIPO</u>	<u>PROVEEDOR</u>
TOP10	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen
BL21(DE3)	F- <i>ompT hsdS_B</i> (<i>r_B-m_B-</i>) <i>gal dcm</i> (DE3)	Invitrogen
BL21(DE3) pLysS	F- <i>ompT hsdS_B</i> (<i>r_B-m_B-</i>) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysS (Cam ^R)	Invitrogen

7.4 CARACTERÍSTICAS DE LOS PLÁSMIDOS UTILIZADOS

<u>PLÁSMIDO</u>	<u>CARACTERÍSTICAS</u>	<u>PROVEEDOR</u>
pTrcHis2 B	Promotor <i>trc</i> Gen de resistencia a ampicilina Región C-terminal de poli-histidinas Epítotope myc C-terminal (Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu-Asn)	Invitrogen
pGEX-6P-1	Promotor <i>tac</i> . Resistencia a ampicilina. Fusión N-terminal a Glutathione S-transferase Sitio de reconocimiento de enzima PreScission Protease	GE Healthcare
pGroES-GroEL	Promotores naturales de las chaperonas Resistencia a tetraciclina Producción de chaperonas GroES y GroEL	Bergès y col. 1996 (pEMR602)

7.5 SOLUCIONES STOCK

<u>SOLUCIÓN</u>	<u>PREPARACIÓN</u>
Ampicilina	100 mg/mL ampicilina en agua desionizada. Almacenar a -20°C. Concentración final de 100 µg/mL.
Cloramfenicol	34 mg/mL cloramfenicol en etanol. Almacenar a -20°C. Concentración final de 34 µg/mL.
Tetraciclina	12.5 mg/mL tetraciclina en etanol. Almacenar a -20°C protegido de la luz. Concentración final de 12.5 µg/mL.
IPTG (200 mM)	Disolver 476 mg IPTG en 10 mL agua desionizada. Esterilizar por filtración. Almacenar a -20°C.

7.6 MEDIOS Y SOLUCIONES

Geles de agarosa al 0.8%

TAE 50X (100 mL)

24.2 g Tris
5.71 mL ácido acético glacial
1.86 g EDTA
pH 8.0 (ya queda ajustado)

Células competentes (Método cloruro de rubidio)

RF1

RbCl 2.4 g
MnCl₂·4H₂O 1.98 g
CaCl₂ 0.30 g
Glicerol 30 mL
Aforar a 200 mL
Esterilizar en autoclave
Agregar 6 mL KAc 1 M

KAc 1 M pH 7.5

0.98 g KAc en 10 mL agua
Ajustar a pH 7.5 con ácido acético
Esterilizar por filtración.

RF2

RbCl 0.24 g
CaCl₂ 2.2 g
Glicerol 30 mL
Aforar a 200 mL
Esterilizar en autoclave
Agregar 4 mL MOPS 0.5 M

MOPS 0.5 M pH 6.8

0.052 g MOPS en 5 mL agua
Ajustar a pH 6.8 con NaOH
Esterilizar por filtración.

Transformación (Choque térmico)

LB AGAR

Agregar 15 g/L de agar al preparar el LB. Esterilizar en autoclave.
Dejar enfriar hasta aprox. 40°C. Agregar el antibiótico necesario.
Vaciar en cajas Petri. Dejar solidificar. Almacenar a 4°C.

Minipreparaciones (Birnboim y Doly)

Solución I

Glucosa 50 mM
Tris-HCl 25 mM, pH 8.0
EDTA 10 mM, pH 8.0
Esterilizar en autoclave.
Almacenar a 4°C.

Solución II

NaOH 0.2 N
SDS 1%

Solución III

Acetato de sodio 3 M, pH 4.8

Ensayos de expresión (5 mL)BUFFER DE LAVADO

Tris 50 mM pH 8.0

NaCl 300 mM

Tritón X-100, 0.1%

Ensayos de expresión (25 mL)BUFFER GUANIDINA FOSFATOS

Fosfato de sodio 20 mM

NaCl 500 mM

Imidazol 45 mM

Guanidina 6 M, pH 8.0

Preparación de geles de acrilamida Tris-Tricina 4 y 15% (SDS-PAGE)**Tabla A1.** Preparación de geles de poli(acrilamida) Tris-Tricina 4 y 15%

REACTIVO	1 gel		2 geles	
	Concentrador	Separador	Concentrador	Separador
Acrilamida	125 µL	1.5 mL	250 µL	3 mL
Agua	625 µL	470 µL	1.25 mL	940 µL
Buffer del gel	250 µL	1.33 mL	500 µL	2.66 mL
Glicerol 70%	-	0.7 mL	-	1.4 mL
PSA 10%	10 µL	40 µL	20 µL	80 µL
TEMED	1.25 µL	2.5 µL	2.5 µL	5 µL
TOTAL	1 mL	4 mL	2 mL	8 mL

BUFFER DEL GEL

(3 M Tris-HCl, 0.3% SDS, pH 8.45)

Disolver 36.4 g Tris en 60 mL ddH₂O. Ajustar a pH 8.45 con HCl.Aforar a 100 mL con ddH₂O. Agregar 0.3g SDS y almacenar a TA.BUFFER DEL CÁTODO 10X (SUPERIOR)

(1 M Tris, 1 M Tricina, 1% SDS, pH 8.25)

Disolver 24.2 g Tris y 35.84 g Tricina en 100 mL ddH₂O. Ajustar a pH 8.25.Agregar 2 g SDS. Aforar a 200 mL ddH₂O. Almacenar a TA.BUFFER DEL ÁNODO 10X (INFERIOR)

(1 M Tris-HCl, pH 8.9)

Disolver 24.2g Tris en 100 mL ddH₂O. Ajustar a pH 8.9 con HCl.

Aforar a 200 mL y almacenar a TA.

Tinción de geles de poliacrilamida (Coomassie)SOLUCIÓN DE TEÑIDO

0.25 g de azul de Coomassie
 45 mL metanol
 45 mL de agua
 10 mL de ácido acético

SOLUCIÓN DE DESTEÑIDO

50 mL de ácido acético
 150 mL de metanol
 300 mL de agua

Cuantificación de proteína (Bradford)**Tabla A2.** Diluciones para la curva estándar de BSA

Dilución	BSA	Agua
0.1 mg/mL	100 μ L	900 μ L
0.2 mg/mL	200 μ L	800 μ L
0.35 mg/mL	350 μ L	650 μ L
0.5 mg/mL	500 μ L	500 μ L
0.65 mg/mL	650 μ L	350 μ L
0.8 mg/mL	800 μ L	200 μ L

Análisis por Western blotBUFFER DE TRANSFERENCIA

Tris 0.3 g
 Glicina 1.44 g
 Metanol 20 mL
 Aforar a 100 mL

BUFFER DE FOSFATASA ALCALINA

Tris 0.1 M
 NaCl 0.1 M
 MgCl₂ 2 mM

PBS (20X)

Disolver 16.36 g de NaCl, 0.402 g de KCl, 2.839 g de Na₂HPO₄ y 0.489 g de KH₂PO₄ en 80 mL de ddH₂O. Ajustar el pH a 7.4 con HCl. Aforar a 100 mL. Esterilizar en autoclave. Almacenar a TA.

PBST

PBS + 0.5% Tween 20

ROJO DE PONCEAU

0.5% Ponceau S + 1% ácido acético

Purificación pTrcHis2 B (resina ProBond)BUFFER LIMPIEZA 1

Fosfato de sodio 20 mM
 NaCl 500 mM
 Imidazol 45 mM
 Tween 20 2%, pH 6.0

BUFFER LIMPIEZA 2

Urea 8 M
 Fosfato de sodio 20 mM
 NaCl 500 mM
 Imidazol 100 mM
 Tween 20 2%, pH 6.0

Purificación pGEX-6P-1 (resina Glutathione Sepharose 4B)**BUFFER GUANIDINA 6 M**

Tris-HCl 20 mM, pH 8.0

NaCl 500 mM

Guanidina 6 M

BUFFER GLUTATHIONE

Tris-HCl 50 mM, pH 8.0

Glutathione reducido 10 mM

Almacenar a -20°C.

Ensayos de actividad ATPasa**REACTIVO DE COLOR (500 mL)**

- 1) 170 mg de verde malaquita en 37.5 mL ddH₂O (libre de Pi). Mezclar con agitador magnético.
 - 2) 5.25 g de molibdato de amonio en 125 mL de solución 4 N HCl (40 mL HCl 38% + 85 mL ddH₂O).
 - 3) Mezclar 1 y 2, ajustar a 500 mL. Mezclar con agitador magnético durante 30 min. Incubar 4°C/TN (1-2 h es suficiente) hasta que la solución se vuelva clara.
 - 4) Filtrar a través de papel Whatman 5 o 6 y guardar a 4°C.
- Antes de usar agregar Tritón X-100 al 0.1% (Para 10 mL agregar 100 µL de Tritón X-100 al 10%).

BUFFER DE REACCIÓN 10XBuffer 500 mM, MgCl₂ 50 mM, L-Cisteína 20 mM. Almacenar a -20°C.**Tabla A3.** Diluciones para la curva estándar de KH₂PO₄

Pi (nmol)	PARA 1 mL	
	Agua (µL)	KH ₂ PO ₄ 0.4 mM (µL)
1	950	50
2	900	100
3	850	150
5	750	250
8	600	400
10	500	500

Tomar 50 µL de cada punto de la curva estándar.

Ensayo de actividad ATPasa en gel**BUFFER DE CORRIDA**

Tris-HCl 20 mM

Glicina 250 mM

pH 8.8

BUFFER DE CARGA NATIVO

Glicerol 20%

Azul de bromofenol 0.2%

Tris 0.12 M

SOLUCIÓN DE TEÑIDO PARA
AGAROSA

Coomassie 0.12%

Metanol 45%

Ácido acético 10%

SOLUCIÓN DE DESTEÑIDO PARA
AGAROSA

Metanol 45%

Ácido acético 10%