

CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA DE CÁPSIDE DE ROTAVIRUS VP6 EN
Saccharomyces cerevisiae PARA SU POTENCIAL USO COMO VACUNA VETERINARIA

William A. Rodríguez-Limas, Jorge L. Folch-Mallol, Octavio T. Ramírez, Laura A. Palomares

Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Apdo. Postal. 510-3. Cuernavaca, Morelos, CP. 62250, México. Teléfono: (52) 777 329-1863 y (52) 77 329-1617. Fax: (52) 777 313-8811. e-mail: william@ibt.unam.mx, laura@ibt.unam.mx

Palabras clave: Vacuna, *Rotavirus*, *Saccharomyces*, cápside

Introducción. Rotavirus es el principal agente causante de diarrea neonatal bovina (1). En un estudio previo de nuestro grupo de investigación, se aislaron y caracterizaron los genes de las proteínas estructurales de cepas representativas de rotavirus bovino circulantes en México (2). Esta información fue el punto de partida para el desarrollo de sistemas de expresión heterólogos capaces de producir estas proteínas virales para su potencial uso en nuevas vacunas veterinarias.

La proteína de cápside VP6 ha demostrado ser la más antigénica y, a pesar de que los anticuerpos dirigidos contra ella no neutralizan el virus completo, se ha mostrado que protegen de la infección de rotavirus interviniendo en el ciclo de replicación viral o actuando en la superficie de las mucosas, excluyendo los virus de los enterocitos blanco (3). El presente trabajo muestra la expresión de la proteína VP6 de rotavirus en *Saccharomyces cerevisiae*, el uso de diferentes cepas y vectores mono y multicopia, así como modificaciones al medio de cultivo para el mejoramiento de la productividad de la proteína heteróloga.

Metodología. Las cepas de *S. cerevisiae* utilizadas para este estudio fueron la W3031a (MATa *ade2-1, ura3-1, his3-11,15, trp1-1, leu2,3-112*) y PJ69-4a (MATa *trp1-901, leu2-3,112, ura3-52, his 3-200, gal4Δ gal80Δ*). Se utilizó el medio sintético completo CSM-trp (glucosa 2%, YNB 0.67%, suplementado con las auxotrofías correspondientes). Las condiciones de cultivo fueron 30°C y 200 rpm. Los plásmidos utilizados son de la serie pRS. El gen de VP6 corresponde a la cepa NCDV de rotavirus bovino y fue clonado bajo el promotor constitutivo PMA1. Se usó la técnica de transformación con acetato de litio para introducir los nuevos vectores. La detección de proteínas heterólogas se realizó por medio de Western Blot y microscopía de inmunofluorescencia.

Resultados y discusión. La construcción en vectores mono y multicopia (pRS7 y pRS8, respectivamente) se realizó de manera eficiente, obteniéndose gran cantidad de transformantes con el plásmido correcto. La selección clonal primaria se realizó utilizando PCR de colonias. Las clonas seleccionadas fueron cultivadas de acuerdo a las condiciones descritas previamente y se realizó extracción de proteína intracelular a lo largo del cultivo. En la fig.1 se observa una cinética de producción de proteína heteróloga para la cepa W3031a que contiene el vector

pRS7VP6. La proteína heteróloga fue el 6.3% y 18% de la proteína intracelular total, para las cepas W3031a y PJ69-4a, respectivamente.

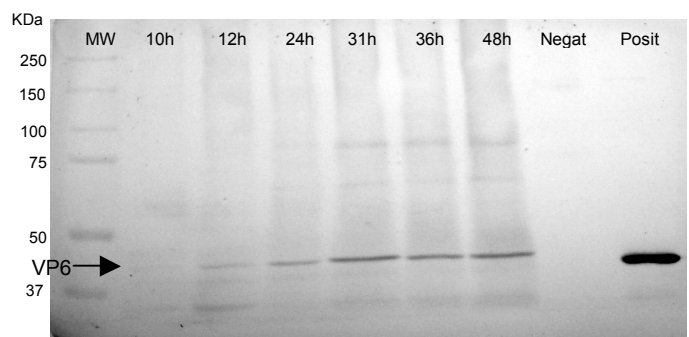


Fig. 1. Western Blot de VP6 en un cultivo de *S.c. W3031a* pRS7VP6. Control positivo: VP6 producida en células de insecto. Control negativo: Extracto celular de la cepa silvestre.

Conclusiones. Este es el primer reporte de producción de la proteína VP6 en levaduras. Se pudo observar que la producción de proteína recombinante fue dependiente de la cepa de levadura utilizada. Además, se obtuvieron mejoras sustanciales en la cantidad de proteína heteróloga al modificar la composición del medio de cultivo adicionando succinato y/o otros aminoácidos (datos no mostrados). Se observó la necesidad de utilizar permanentemente el medio de selección, ya que las pérdidas de plásmidos multi y monocopia pudo ser corroborada por microscopía de inmunofluorescencia.

Agradecimientos. Apoyo económico CONACyT Salud 2007-c01-69911, PAPIIT-UNAM IN-223805 e IN-206407. Asistencia técnica de V. Hernández. Rodríguez-Limas agradece el apoyo mediante beca CONACyT No. 210328.

Bibliografía.

- Holland, RE. (1990). Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. *Clin. Microb. Rev.* 3: 345-375.
- Rodríguez-Limas WA, Flores-Samaniego B, De la Mora G, Ramírez OT, Palomares LA. (2009). Genotypification of Bovine Group A Rotavirus in Mexico. *Vaccine.* (Aceptado).
- Corthésy, B., Benureau, Y., Perrier, C., Fourgeux, C., Parez, N., Greenberg, H., Schwartz-Cornil, I. (2006). Rotavirus anti-VP6 secretory immunoglobulin A contributes to protection via intracellular neutralization but not via immune exclusion. *J. Virol.* 80(21): 10692-10699.