

ESTUDIO *IN VITRO* DEL ENSAMBLAJE DE LAS PSEUDO-PARTICULAS VIRALES DE ROTAVIRUS

Jimmy A. Mena, Octavio Tonatiuh Ramírez y Laura A. Palomares

Instituto de Biotecnología, UNAM. Av. Universidad # 2001, Cuernavaca 62210, Morelos,

Fax: (52)(777) 3291617, e-mail: laura@ibt.unam.mx

Palabras clave: *ensamblaje viral, pseudo-partículas virales, células de insecto*

Introducción. La pseudo-partículas virales (PPV) son de interés en diferentes áreas como la vacunación, terapia génica y nanomateriales [1]. El sistema de células de insecto-baculovirus (CI-BV) es el más utilizado para la producción de PPV (rotavirus, HIV, Hepatitis B) [1], pero aun existen varios aspectos acerca de su ensamblaje que no están comprendidos y son necesarios evaluar para maximizar la producción de PPV. Entre estos aspectos está el ensamblaje de las PPV en un ambiente celular diferente y en ausencia de otras proteínas no estructurales. En el caso de PPV de rotavirus, se ha reportado que al expresar VP2, se forman nucleocapsides (en agregados altamente ordenados) en el citoplasma. En cambio, la expresión de VP6 resulta en estructuras tubulares alrededor del citoplasma. En contraste, cuando ambas proteínas fueron coexpresadas en la misma célula, no se observaron túbulos y VP6 colocalizó con VP2, formando la partícula de doble capa 2/6 en el citoplasma [2]. Para comprender el proceso de ensamblaje, en este trabajo se analizó el ensamblaje *in vitro* de las PPV formada por las proteínas VP2 y VP6, con el objetivo de determinar las variables que controlan el armado de las PPV en las células de insecto

Metodología. Las proteínas estructurales y PPV se produjeron utilizando el sistema CI-BV [2]. El análisis *in vitro* se realizó mediante técnicas de dispersión estática de luz, cromatografía líquida de permeación en gel y microscopía electrónica. Se evaluó el desensamblaje y re-ensamblaje de los túbulos de VP6 y 2/6 PPV a diferentes concentraciones de calcio, temperatura y concentración de proteínas.

Resultados y Discusión. Inicialmente se estudió el desensamblaje de VP6 que fue producida y purificada en su forma tubular (Fig. 1A). En la Figura 1B se observa que el desensamblaje de VP6 tuvo un decaimiento exponencial, y además, mediante cromatografía líquida se determinó que el producto final corresponde a monómeros de VP6. La estructura de VP6 en los túbulos o en 2/6 PPV es trimérica. Al realizar el ajuste de los datos a diferentes modelos, se determinó que el desensamblaje siguió un modelo exponencial en dos etapas. Donde la primera etapa tuvo una velocidad de desensamblaje (k_1) un orden de magnitud mayor que la segunda etapa (k_2). Posteriormente, se observó que el re-ensamblaje de los tubulos mediante la remoción de calcio (EGTA) fue un proceso dependiente de la concentración de VP6, ya que a 1 μM de VP6 no hubo reacción. Solo a partir de 10 μM de VP6 los tubulos se re-ensamblaron y se observaron claramente las dos etapas descritas en el desensamblaje (Fig 1C). Primero la formación de los trímeros y después la formación de los tubulos. El mismo análisis se realizó para la 2/6 PPV. Este desensamblaje también siguió un decaimiento exponencial en dos etapas, pero k_1 fue mayor en comparación con el desensamblaje de los túbulos. En

contraste, durante el ensamblaje de 2/6 PPV se observó que el proceso también fue dependiente de concentración de VP6 (Fig. 1D), pero esta cinética pudo ser descrita por un modelo de primer orden. Además, la velocidad del ensamblaje de 2/6 PPV fue 2 ordenes de magnitud mayor en comparación con el ensamblaje tubular. Este resultado explica porque en la co-expresión de VP6 y VP2 (*in vivo*), no se observa formación de túbulos y que la alta diferencia en las velocidades de reacción favorece la formación de la 2/6 PPV.

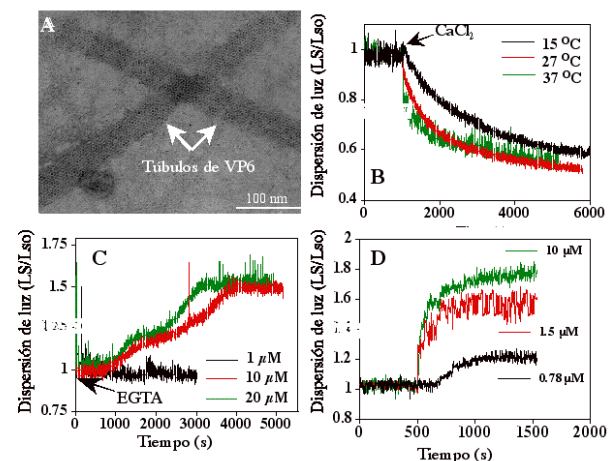


Figura 1. Desensamblaje y re-ensamblaje de túbulos de VP6 y 2/6 PPV. A. Micrografía electrónica de túbulos de VP6. B. Cinética de desensamblaje de VP6 a diferentes temperaturas a 10 mM de CaCl_2 . C. Re-ensamblaje de túbulos de VP6 a diferentes concentraciones de proteína y 27 °C. D. Ensamblaje de 2/6 PPV a diferentes concentraciones de VP6 y 27 °C.

Conclusiones. Mediante estos resultados se caracterizó el proceso de ensamblaje de la 2/6 PPV. se observó que la formación de la 2/6 es favorecida cinéticamente sobre la de VP6 en túbulos, pero es necesario tener una concentración mínima de VP6 para iniciar el ensamblaje. Además, estos resultados corroboran lo observado anteriormente en el ensamblaje *in vivo* [2]. Estos resultados además de ser fundamentales para la producción de PPV, también son muy importantes para la manipulación del ensamblaje en la producción de nanomateriales.

Agradecimientos. Trabajo financiado por Conacyt-Sagarpa 2004-C01-103, DGEP-UNAM, Conacyt-Morelos MOR-2004-C02-058, UNAM-PAPIIT 223805 y 206407

Bibliografía

- Palomares L.A., Estrada-Mondaca S., Ramirez O.T. 2006. "Principles and Applications of the Insect Cell-Baculovirus Expression Vector System" In: Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cellular Applications. S. Ozturk, W. S. Hu (eds.) Taylor and Francis. New York.
- Mena J.A., Ramírez O.T., Palomares L.A., 2006. Intracellular distribution of rotavirus structural proteins and virus-like particles expressed in the insect-cell baculovirus system. Journal of Biotechnology. 122: 443-452