

EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS NSP5 Y NSP6 DE ROTAVIRUS PORCINO YM EN *Escherichia coli*

Midory Samaniego¹, Carlos Arias², Ana Paulina Barba^{1*}

¹ Depto. Biología Molecular, IPICYT, Av. Venustiano Carranza 2425-A, Col. Bellas Lomas 78210, SLP, SLP; ² Depto. Genética y Fisología Molecular, IBT-UNAM; * fax: (444) 8335412, apbarba@ipicyt.edu.mx

Palabras clave: rotavirus, GST, cristalización.

Introducción. Los rotavirus son una de las causas principales de gastroenteritis infantil severa en el ámbito mundial en niños menores de 5 años de edad⁽¹⁾ estimándose que una vacuna efectiva contra estos virus podría evitar cerca de 800,000 muertes de infantes cada año. Las proteínas no estructurales (NSP) 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, 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. Las proteínas NSP5 y NSP6 se localizan en los viroplasmos, cuerpos de inclusión citoplasmáticos presentes en las células infectadas por rotavirus, lo que indica su participación en el proceso replicativo de estos virus⁽²⁾. El objetivo del trabajo es expresar las proteínas NSP5 y NSP6 de rotavirus en *Escherichia coli*.

Metodología. Se diseñaron los oligonucleótidos apropiados para la amplificación de los genes que codifican para NSP5 y NSP6 incluyendo los sitios de corte BamHI-SalI y BamHI-XhoI para las construcciones en pGEX y pTrc, respectivamente; el marco de lectura se confirmó por secuenciación. Para la expresión de las proteínas, TOP10 se transformó con las construcciones pTrc-NSP(5/6) y BL21 con pGEX-NSP(5/6).

Resultados y discusión. La proteína clonada en el vector pET28 en trabajos anteriores no logró un nivel de expresión apreciable por lo que se procedió a buscar otros vectores apropiados para la expresión. El vector pTrc (Invitrogen) fue diseñado para la expresión de proteínas tóxicas e incluye seis histidinas que se expresan como parte de la proteína recombinante lo que facilita su purificación aun en condiciones desnaturalizantes. El vector pGEX (Amersham) expresa la proteína glutathione S-transferase (GST) fusionada a la proteína facilitando su purificación y estabilizando el plegamiento adecuado de las proteínas, además con el uso alternativo de una proteasa específica se puede lograr la separación posterior de ambas proteínas⁽³⁾. Se determinaron que las mejores condiciones de expresión en medio LB fueron a temperatura de incubación de 37°C usando IPTG como inductor a una concentración de 0.4 mM. La expresión en pTrc fue menor a la obtenida con pGEX, en la Figura 1 se muestra la expresión de las proteínas con las construcciones pGEX. Las proteínas NSP5, NSP6 y GST

tienen pesos moleculares de 34, 11 y 26 kDa respectivamente, debido a esto, los productos proteínicos observados para las construcciones en los vectores pGEX son de 50 kDa para NSP5 y de 37 para NSP6.

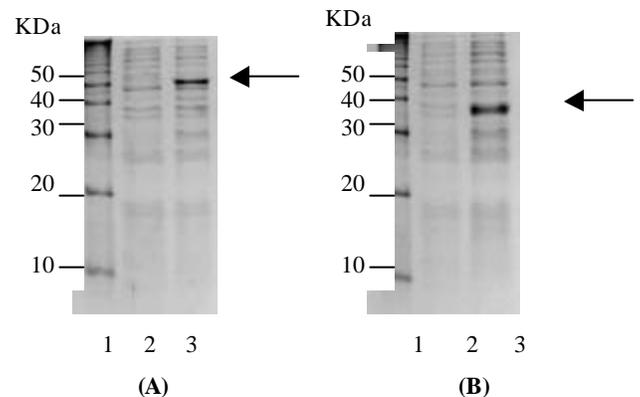


Fig. 1. Expresión de las proteínas NSP en E.coli. A) Expresión de NSP5 y B) NSP6 en pGEX. Carriles 1: Marcador de peso molecular de 10 kDa; carriles 2: Expresión antes de la inducción; carriles 3: Expresión después de la inducción con IPTG

Conclusiones. Se obtuvo la expresión de las proteínas NSP5 y NSP6 en los vectores pTrc y pGEX. Se seleccionó a la construcción con pGEX para purificar la proteína a través de columnas de afinidad de GST procediendo con su cristalización. La obtención de cristales constituye la primera etapa para el análisis de difracción por rayos X y la determinación de la estructura tridimensional. Esta información es la base para el diseño racional de fármacos que podrán ser dirigidos al desarrollo de nuevas vacunas contra rotavirus.

Agradecimiento. Apoyo de Conacyt 33151-N.

Bibliografía.

1. Kombo, L, Gerber M, Pickering, L, Atreya C, Breiman, R. (2001). Intussusception, infection, and immunization: Summary of a workshop on rotavirus. *Pediatrics*. 108(2).
2. Torres-Vega, M, González, R, Duarte, M, Poncet, D, López, S, Arias, C. (2000). The Cterminal domain of rotavirus NSP5 is essential for its multimerization, hyperphosphorylation and interaction with NSP6. *J. Gen. Vir.* 81:821-830.
3. Amersham pharmaia biotech. (2001). Chapter 1. En: *The recombinant protein handbook*. Suecia. 7-8.