

DISTRIBUCION DE LAS PROTEINAS ESTRUCTURALES DE ROTAVIRUS EXPRESADAS EN EL SISTEMA CELULAS DE INSECTO-BACULOVIRUS

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

Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos

Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México

Av. Universidad # 2001, Cuernavaca 62210, Morelos, MEXICO

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

Palabras clave: *Pseudo-partículas virales, rotavirus, inmunofluorescencia*

Introducción. La infección por rotavirus es la principal causa de gastroenteritis infantil en México. Debido a su alta incidencia es de interés desarrollar vacunas para rotavirus, siendo una de las alternativas el uso de pseudo-partículas virales (PPV's). Las PPV's son partículas formadas por las proteínas estructurales del virus pero sin el material genético. Las PPV's se obtienen de manera recombinante en el sistema de expresión células de insecto-baculovirus (CI-BV), por lo que este trabajo se enfocó en el estudio de la localización de las proteínas estructurales y las PPV's en las células de insecto. El entendimiento, localización y manipulación del ensamblaje de las PPV's en el sistema CI-BV, ayudará al desarrollo de estrategias racionales de producción a gran escala

Metodología. La línea celular utilizada fue High Five® derivada de insecto *Trichoplusia ni*. Se hicieron infecciones individuales con los baculovirus que codifican para las proteínas de rotavirus VP6, VP2 (cepa RF) y GFPVP2 (proteína de fusión GFP y VP2) a multiplicidad de infección (MDI) de 1 ufp/célula. Además se coinfectó con los baculovirus VP6 y VP2 (RF) a MDI 1 ufp/cél, y con los baculovirus VP6 y GFPVP2 a MDI 1 ufp/cél. Se hicieron ensayos de inmunofluorescencia con un anticuerpo primario policlonal anti-rotavirus de conejo y un anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a Alexa Fluor 568 (Molecular Probes) a las 24, 48, 72 y 96 horas. Se determinó en microscopio de epifluorescencia la localización de las proteínas VP6, VP2(RF) y GFPVP2.

Resultados y Discusión. En las cinéticas de producción de las proteínas VP6 y GFPVP2 a diferentes MDI se encontró que más del 75% de VP6 estaba en el sobrenadante del cultivo, mientras que de GFPVP2 solo el 2%, por lo que se infirió una distribución en citoplasma para la proteína VP6 y en membranas para la proteína GFPVP2. En la Figura 1 se observa la localización intracelular de las proteínas GFPVP2, VP2(RF), VP6. En las figuras 1a, 1b, y 1c se evidencia que la proteína VP2 se asocia preferentemente a la membrana citoplasmática de la célula de insecto. En la literatura se ha reportado que la proteína VP6 se encuentra difundida en el citoplasma (1). En las figuras 1d y 1e se observa que en las primeras horas de infección sí se distribuye en el citoplasma, pero después de las 48 horas se asocia principalmente al citoesqueleto. En las figuras 1f y 1g se muestran las células produciendo simultáneamente VP2 y VP6. En estas figuras se observan patrones similares que cuando se produjeron individualmente GFPVP2, VP2(RF) y VP6. No se identificó un patrón diferente que permitiera inferir la localización de las PPV's.

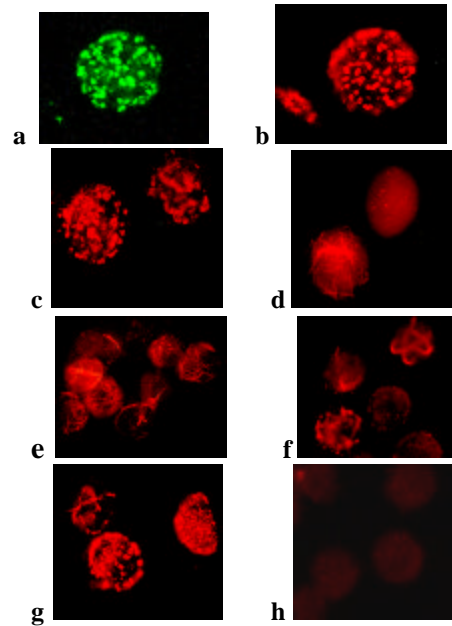


Figura 1. Células H5 infectadas a 48h postinfección. (a) GFPVP2 a 510 nm. (b) GFPVP2 a 568 nm (c) VP2 (RF). (d) VP6 24 h postinfección. (e) VP6 48h postinfección. (f) coinfección GFPVP2 y VP6. (g) coinfección VP2 (RF) y VP6. (h) células H5 sin infectar.

Conclusiones. Se comprobó que la proteína VP2 expresada de forma recombinante en células de insecto se asocia a la membrana citoplasmática, además que este patrón de localización también se observó en la proteína de fusión GFPVP2. Aunque en fases tempranas de infección la proteína VP6 se difunde en el citoplasma se determinó que después de las 24h postinfección se asocia al citoesqueleto. Estos patrones de localización celular serán útiles en el diseño de estrategias para optimizar el ensamblaje y purificación de las pseudo-partículas virales producidas en el sistema CI-BV.

Agradecimientos. A Vanesa López Guerrero por su apoyo técnico. Trabajo financiado por CONACYT (NC-230, 33348-B) y DGAPA-UNAM (IN218202)

Bibliografía

1. Lepault J., Petitpas I., Erk I., Navaza J., Bigot D., Dona M., Vachete P., Cohen J., Rey F. 2001. Structural polymorphism of the major capsid protein of rotavirus. *EMBO Journal*. 2001 (20): 1498-1507
2. Palomares L. A., López S., Ramírez O. T. 2002. Strategies for manipulating the relative concentration of recombinant rotavirus structural proteins during simultaneous production by insect cells. *Biotechnology and Bioengineering*. 78 (6): 635-644.