



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA DEL DESARROLLO Y
FISIOLOGÍA MOLECULAR**

**“OBTENCION DE BACULOVIRUS RECOMBINANTES QUE
EXPRESAN LA PROTEÍNA ESTRUCTURAL DE
ASTROVIRUS”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

PRESENTA:

LIC. EN C. MARÍA DE LOURDES GÁNDARA SUÁREZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. ERNESTO MÉNDEZ SALINAS

CUERNAVACA, MORELOS

MAYO, 2010





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

In Memoriam
Manuel Gándara Mendieta
(1907-2008)
Gran abuelo y padre

Este trabajo no sólo está dedicado a la memoria de mi abuelito Manuel, sino también a las personas más importantes de mi vida: mis padres, Lulú y Felipe, mis hermanos, Mari y Pipe, y a Fer.

Gracias por su apoyo incondicional.

Agradecimientos

- Dr. Ernesto Méndez Salinas (Director de Tesis)
- Dra. Rosamaría del Ángel (Comité Tutoral)
- Dra. Laura Palomares (Comité Tutoral)
- Dra. Lorena Gutiérrez (Jurado Examen de Grado)
- Dra. Rosana Sánchez López (Jurado Examen de Grado)
- Dr. Fernando Esquivel Guadarrama (Jurado Examen de Grado)
- Dr. Enrique Rudiño Piñera (Jurado Examen de Grado)
- Dra. Susana López (Jefe de Grupo)
- Dr. Carlos Arias (Jefe de Grupo)

María de Lourdes Gándara Suárez contó con una beca de CONACyT durante el periodo del 2007-2009

INDICE	i
AGRADECIMIENTOS	ii
RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	2
1. Clasificación	2
2. Patogénesis	3
3. Genoma y proteínas de AstV	5
3.1. ORF 1a	6
3.2. ORF 1b	7
3.3 Estructura del ORF2	7
4. Ciclo Replicativo de HAstV	9
II. JUSTIFICACION	14
III. HIPÓTESIS	14
IV. OBJETIVOS	15
V. METODOLOGÍA	16
1. Células de insecto sf9	17
2. Construcción de los Baculovirus Recombinantes	17
2.1. Construcción de los Vectores Donadores	17
2.2 Obtención de los Búcidos Recombinantes	18
2.3 Baculovirus Recombinantes	18
3. Estandarización de las Condiciones de Infección	19
3.1 Infecciones	19
3.2. Análisis de la Proteína Viral por Inmunoensayos	19
a) Procesamientos de las pastillas	19
b) Western blots	19
4. Purificación de la Proteína	20
4.1 Purificación de la proteína contenida en la fracción celular	20
4.2 Purificación de la proteína contenida en el sobrenadante	21
VI. RESULTADOS	22
1. Generación de los baculovirus recombinantes	22
2. Estandarización de las condiciones de infección	24
3. Purificación de la proteína	28
3.1 Purificación de la proteína contenida en la fracción celular	29
3.2. Purificación de la proteína contenida en el sobrenadante	31
4 Análisis de los productos derivados de la proteólisis por tripsina	34
VII. DISCUSIÓN	38
VIII. CONCLUSIONES	43
IX. PERSPECTIVAS	43
X. REFERENCIAS	4

Resumen

Los HAstV se encuentran entre las principales causas de gastroenteritis viral afectando principalmente a niños, adultos mayores y personas inmunocomprometidas, provocando síntomas como diarrea, dolor abdominal, vómito y fiebre. A pesar de su importancia epidemiológica hay muchos aspectos de la biología del virus que se desconocen, por lo que es importante el desarrollo de una herramienta que permita elucidar aspectos relacionados con la entrada y morfogénesis del virus.

En este trabajo se construyeron dos baculovirus recombinantes que expresan la proteína de la cápside del virus VP90 y otro que expresa la proteína GFP/VP90 (resultado del reemplazo de los primeros aminoácidos de VP90 por la proteína GFP), con estos baculovirus recombinantes se infectaron cultivos de células de insecto sf9 lo que permitió obtener grandes cantidades de ambas proteínas. Los primeros análisis de contenido proteico de los cultivos de células sf9 infectados con los baculovirus mostró que las proteínas recombinantes se encuentran asociadas a la fracción celular, por lo que, los cultivos se lisaron para liberar dichas proteínas. Como resultado de la lisis celular, se observó parte de las proteínas era liberada al sobrenadante, pero gran cantidad seguía asociada a la fracción celular por lo que se utilizó el método de purificación reportado por Bonaparte y colaboradores ^{Bonaparte (2008)}, que permite la purificación de proteína a partir de agregados proteicos.

Como parte del análisis de las proteínas purificadas, se analizó el patrón de procesamiento por tripsina de ambas proteínas (VP90 y GFP/VP90). Para estos ensayos se incubaron las proteínas con diferentes concentraciones de tripsina y se comparó el patrón obtenido con el reportado para el virus nativo. Se encontró que al menos la región carboxilo terminal de dichas proteínas tiene una conformación similar a la proteína VP90 nativa ya que se obtuvieron patrones de procesamiento similares a los reportados con el virus nativo.

1. Introducción

Los Astrovirus (AstV) fueron detectados por primera vez en 1975 por Appleton y Higgins, a través de observaciones al microscopio electrónico (ME) de muestras fecales de niños hospitalizados con diarrea debido a un brote de gastroenteritis Matsui (1996); Monroe (2001). Ellos reportaron la presencia de partículas virales con un diámetro entre los 29 y 30 nm que presentaban una morfología diferente a la de Rotavirus y a la del virus Norwalk, conocidos entonces como causantes de diarrea. Ese mismo año, Madeley y Cosgrove, reportaron la presencia de pequeñas estructuras virales en heces de infantes con diarrea, donde el 10% de dichas partículas presentaban una configuración de estrella de 5 a 6 picos, por lo que les nombraron Astrovirus (Figura 1).

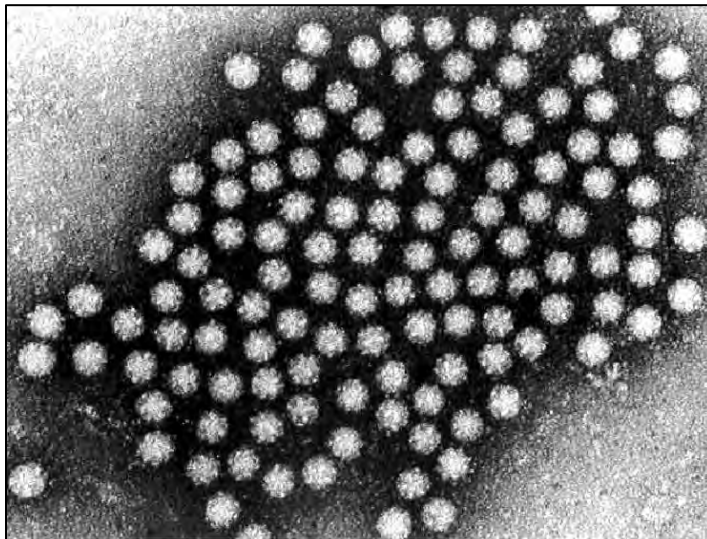


Figura 1.- Tinción negativa de partículas de *Astrovirus* presentes en una muestra fecal y observadas al microscopio electrónico. Imagen tomada de: www.oardc.ohio-state.edu

1.- Clasificación

Los AstV conforman a la familia *Astroviridae*, que incluye virus tanto de origen humano (HAstV) como de origen animal. La familia *Astroviridae* se divide en dos géneros: los *Mamastrovirus* que infectan mamíferos Matsui (1996) como cerdos Shimizu (1990) perros Marshall (1984), gatos Hoshino (1981), ratones Kjeldsberg (1985), ovejas Snodgrass (1977), hurones Englund (2002) y murciélagos Zhu (2009); y los *Avastrovirus* que infectan aves Méndez (2007) como patos, pavos Koci (2002) y pollos Imada (2000).

En general, la infección por los AstV de ambos géneros está asociada con la gastroenteritis, pero se ha reportado que los *Avastrovirus* también generan infecciones extraintestinales provocando enfermedades de mayor severidad (se mencionará más adelante) Matsui (1996), Koci (2002). En el caso de los virus aislados de murciélagos, aún no se ha determinado si causan alguna enfermedad.

Los AstV humanos (HAstV) se han incluido dentro del género de los *Mamastrovirus*. Se han identificado ocho serotipos, siendo el serotipo uno (HAstV-1) el que más frecuentemente se encuentra en la población; por otro lado, virus que pertenecen a los serotipos siete (HAstV-7) y ocho (HAstV-8) son menos frecuentes Geigenmüller (2003). Todos los serotipos de AstV humanos se encuentran relacionados filogenéticamente y comparten epítopes de la proteína estructural, lo que ha permitido la generación de ensayos de diagnóstico Méndez (2007).

Recientemente por análisis metagenómico a partir de una muestra fecal de un niño australiano con diarrea aguda Finkbeiner (2008a) se identificó un virus que presenta la misma organización que el genoma de los AstV. Debido a la relación filogenética de este virus con los otros miembros de la familia, se sugirió que podría tratarse de una nueva especie dentro esta familia y se denominó como AstV-MLB1.

2.- Patogénesis

La infección por HAstV afecta principalmente a niños, adultos mayores y a personas inmunocomprometidas provocando diarrea, dolor abdominal, vómito y fiebre. Estos virus se transmiten por la vía fecal-oral por lo que la ingestión de alimentos y agua contaminados han sido causa de brotes de gastroenteritis Matsui (1996); Méndez (2007). La infección por HAstV parece estar limitada a los enterocitos maduros de las microvellosidades del intestino delgado Matsui (1996) y no produce cambios histológicos drásticos de la zona de la infección Méndez (2007). Sin embargo, algunos AstV animales, como el AstV Bovino (BAstV), pueden infectar células diferentes a los enterocitos, como macrófagos intraepiteliales, células del domo Woode (1984) y células M Matsui (1996). Por otro lado, los AstV de pavo (TAstV) pueden causar viremia y afectar otros órganos Moser (2005). Esta diferencia en el tropismo puede ser la razón de que, a diferencia de los HAstV, la infección por AstV animales se asocia a diferentes enfermedades.

La infección por TAsTV provoca el síndrome de enteritis mortal, caracterizado por la inducción de enteritis aguda, bloqueo del crecimiento, atrofia linfocítica, inmunosupresión y altas tasas de mortalidad de los polluelos de pavo Koci (2002), Moser (2005), Méndez (2007). La infección por AstV de pato (DAsTV) provoca hepatitis severa, cuya mortalidad se relaciona con la edad de los polluelos Koci (2002), por lo que ha sido posible detectar partículas virales tanto en el hígado como en las heces. El virus de nefritis aviar (ANV, por sus siglas en inglés de “Avian Nephritis Virus”), provoca nefritis intersticial en los polluelos infectados causando el retardo de su crecimiento Koci (2002), Moser (2005).

A pesar de que la infección por AstV puede ser severa, como en los casos anteriormente mencionados, no se ha observado daño significativo del epitelio intestinal que justifique la presencia de diarrea ni evidencias de la activación de una respuesta inflamatoria robusta durante la infección Koci (2003). Sin embargo, en pavos infectados por TAsTV-1, la actividad específica de la maltasa intestinal disminuye significativamente Thouvenelle (1995), sugiriendo que la mala digestión de los disacáridos y la pérdida de absorción podrían ser causantes de diarrea osmótica Thouvenelle (1995). En líneas celulares derivadas de epitelio intestinal se ha observado que tanto el virus HAsTV-1 inactivado con luz U.V., como su proteína ensamblada en partículas semejantes a virus (VLPs del Inglés “Viral Like-Particles”) aumentan la permeabilidad de la monocapa, sugiriendo que la infección del virus provoca una desorganización de las proteínas encargadas de la formación de las uniones estrechas (“tight junctions”) del epitelio Moser (2007) contribuyendo así a la diarrea osmótica.

En la infección por BAsTV se observan células M infectadas que contienen partículas virales Koci (2005). Debido a que estas células se encargan del transporte de antígenos a células dendríticas y macrófagos que se encuentran en el domo de las placas de Peyer, la necrosis observada podría resultar en una respuesta inflamatoria intestinal disminuida. La población de las células M es tan reducida que su necrosis podría ser no significativa para provocar cambios histológicos importantes Koci (2005). Adicionalmente, se encontró que tanto la proteína estructural de HAsTV-1 como el virus completo se unen a la proteína C1q del sistema del complemento, evitando su activación Bonaparte (2008) y por lo tanto, una respuesta inflamatoria adecuada. De esta manera, al parecer no existe una respuesta inflamatoria intestinal durante la infección con astrovirus.

3.- Genoma y proteínas de AstV

El genoma de los AstV consiste de una molécula de RNA poliadenilado de cadena sencilla con polaridad positiva (RNAs(+)) (Figura 2A), lo que indica que puede funcionar como RNA mensajero e iniciar una infección productiva, por lo que se dice que el genoma de los AstV es infeccioso Méndez (2007). Esto se ha demostrado introduciendo el RNA genómico de HAstV-1 en células de riñón de hámster (BHK del Inglés “Baby Hamster Kidney”) y recuperando partículas virales Matsui (2001); Geigenmüller (2003).

Dependiendo de la cepa del virus, el tamaño del genoma puede variar entre 6.4 a 7.3 kb de longitud sin tomar en cuenta la cola de poli(A) que puede alcanzar hasta 30 residuos (Figura 2A) Matsui (2001). El genoma se organiza en tres marcos de lectura (ORFs, del Inglés “Open Reading Frames”), que codifican para las proteínas no estructurales que participan en la replicación del genoma (ORF1a y ORF1b) y para la poliproteína precursora de la cápside viral (Figura 2A) (ORF2) Matsui (2001). Incluye además una región 5'-NTR (del Inglés “Non-Translated Region”) y una región 3'-NTR, de aproximadamente 80 nucleótidos cada una, respectivamente Méndez-Toss (2000).

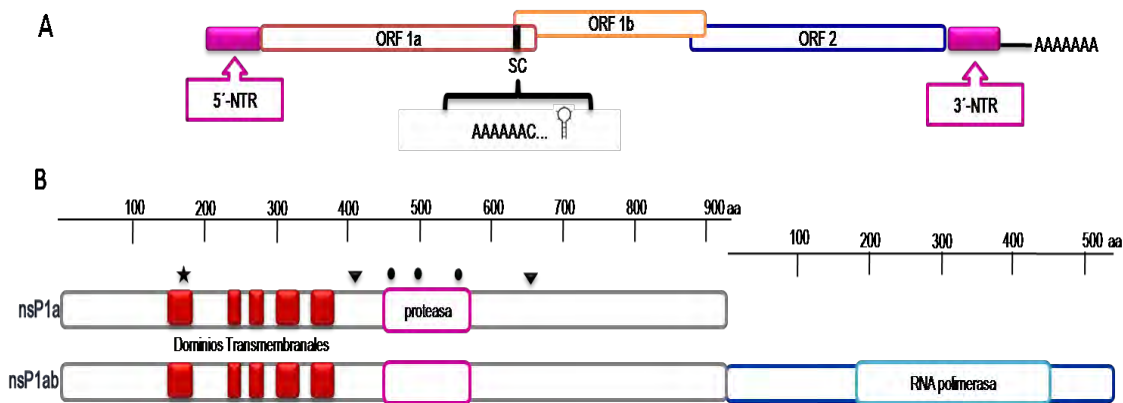


Figura 2.- Organización del genoma y proteínas no estructurales de los *Astrovirus*. **A)** Diagrama del genoma de los HAstV que incluye dos regiones no traducidas (NTR) y tres marcos de lectura (ORF). Entre los ORF1a y ORF1b hay un sobrelape de 70 pb donde se encuentra la señal de cambio de marco de lectura (SC) necesaria para la expresión del ORF1b. **B)** Diagrama de las proteínas no estructurales de HAstV. La proteína nsP1a se encuentra codificada en el ORF1a y tiene de 920 a 935 aminoácidos de longitud. La secuencia de la proteína incluye un motivo de serinproteasa (recuadro rosa) precedido por una serie de dominios transmembranales (recuadros rojos). El sitio catalítico de la serinproteasa lo conforman los aminoácidos: His461, Asp498 y Ser551 (●). Se han identificado tres sitios de procesamiento en nsP1a: el aminoácido 170 (★) que es procesado por alguna proteasa celular y los aminoácidos 410 y 655 (▼) que son procesados por la serin-proteasa viral aunque existen otros que no han sido identificados. La proteína nsP1ab contiene, además de nsP1a, a la RNA polimerasa dependiente de RNA (recuadro azul cielo), la expresión de esta proteína se genera por una señal de cambio de fase en la traducción. Ambas poliproteínas se procesan por la proteasa viral principalmente.

3.1.- ORF1a

El ORF1a varía entre 2,535 y 2,808 nucleótidos y se traduce a una proteína de entre 920 y 935 aminoácidos, denominada nsP1a (Figura 2B). La secuencia de la proteína incluye un motivo de serin-proteasa similar a la proteasa 3C de Picornavirus Jiang (1993), precedido por una serie de motivos transmembranales Geigenmüller (2002b), Méndez (2007). La triada de aminoácidos que forma el sitio catalítico de la proteasa incluye los aminoácidos: His461, Asp498 y Ser551, que se conservan entre los serotipos humanos de AstV (Figura 2B) Kiang (2002).

La proteína nsP1a de HAstV-1 es procesada proteolíticamente resultando en productos finales de entre 5.5 y 26 kDa, con intermediarios de diferentes longitudes, sin embargo solo se han identificado 3 sitios de corte en los aminoácidos 170, 410 y 655 (Figura 2B) Geigenmüller (2002b); que se procesan de manera cotraduccional. El procesamiento en el aminoácido 170 no se afecta cuando la proteasa viral se inactiva por mutagénesis dirigida, lo que sugiere que este procesamiento depende de proteasas celulares Geigenmüller (2002b). Los cortes en los aminoácidos 410 y 655 dependen de la serin-proteasa viral. Los tres productos derivados de nsp1a que han sido claramente identificados incluyen el producto N-terminal de 20 kDa que se asocia a membranas, el producto de 27 kDa que incluye el motivo de serin-proteasa y un producto derivado del carboxilo terminal, que se fosforila Caballero (2004) y parece tener una función en la transcripción y replicación del genoma Geigenmüller (2002b), Matsui (2001).

El análisis comparativo de la secuencia de nsp1a ha revelado la posible existencia de una proteína asociada al genoma, por su similitud con la proteína VPg de Calicivirus Jiang (1993), que podría participar en la replicación del genoma viral (tal como en el caso de Poliovirus), o en la traducción de su genoma (como en Calicivirus), aunque no se ha confirmado su existencia Geigenmüller (2003). Por otro lado, no se ha identificado un dominio de RNA-helicasa, lo cual resulta sorprendente, ya que en el resto de los virus de RNAs(+) que se han caracterizado y que tienen un genoma mayor de 5.8 kb codifican para, al menos, una helicasa Jiang (1993), Geigenmüller (2003), enzima importante durante la replicación del RNA viral.

3.2.- ORF1b

Este ORF tiene una longitud de entre 1,527 y 1,617 nucleótidos y se sobrelapa con el ORF1a en 70 nucleótidos (figura 2A) Lewis (1994). Esta región es altamente conservada entre los HAstV, y se ha identificado una señal que determina el cambio de fase de traducción para producir una proteína que deriva del ORF1a y del ORF1b, denominada nsP1ab. La señal consiste de un heptámero (AAAAAAC) seguido de secuencias capaces de formar estructuras tallo-asa (figura 2A) Geigenmuller (2002b). La proteína nsP1ab Lewis (1995) es procesada por la proteasa viral para producir una proteína de 57 kDa que representa a la RNA-polimerasa dependiente de RNA (figura 2B) Lewis (1994).

3.3.- Estructura del ORF2

La longitud del ORF2 varía entre 2,016 y 2,448 nucleótidos (672- 816 aminoácidos) dependiendo del serotipo del virus, en el caso de los HAstV (figura 2A) Geigenmuller (2002a). El producto principal de este ORF es la poliproteína precursora de la cápside viral cuyo tamaño varía entre los 87 y 90 kDa, por lo que se le ha denominado VP90 en el caso de HAstV-8 (figura 3) Méndez (2004). De acuerdo a su grado de identidad entre cepas de diferentes serotipos, se han definido dos regiones en esta proteína (figura 3).

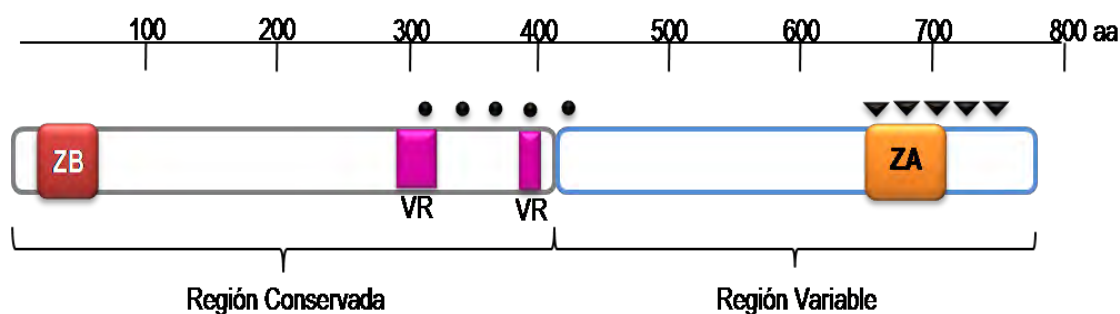


Figura 3.- Organización de la proteína estructural VP90 de *Astrovirus*. El producto principal del ORF 2 es la poliproteína precursora de la cápside viral cuyo tamaño varía entre los 87 y 90 kDa. Esta proteína tiene una región altamente conservada entre los diferentes serotipos de HAstV (primeros 415 aa) y una región variable. Dentro de la región conservada hay una zona rica en aminoácidos básicos (ZB), dos regiones hipervariables (VR) y varios sitios susceptibles al corte por tripsina (●); dentro de la región variable hay una zona rica en aminoácidos ácidos (ZA) y varios sitios similares a los motivos que son identificados y procesados por caspasas celulares (▼).

La región conservada incluye los primeros 415 aminoácidos de la proteína y presenta identidades mayores al 81% (figura 3) Méndez-Toss (2000). Dentro de esta región existe una zona muy rica en aminoácidos básicos (ZB) entre el aminoácido 18 y el 62 (figura 3). Las proteínas estructurales de otros

virus de RNA con estructura icosaédrica, como los virus Norwalk, Sindbis y Poliovirus Schneemann (2006), poseen regiones ricas en aminoácidos básicos que se encuentran involucradas en la unión y empaquetamiento del genoma viral, por lo que se piensa que esta región de VP90 podría ser importante para encapsidar al RNA genómico de astrovirus. Dentro de los primeros 415 aminoácidos también existen dos pequeñas regiones variables (entre los aminoácidos 292-319 y 387-399), que contienen residuos susceptibles al procesamiento por tripsina totalmente conservados (figura 3) Méndez-Toss (2000). Esta región parece formar la parte interna de la estructura de la cápside y por lo tanto formaría la base estructural del virión.

La región carboxilo terminal de VP90, que incluye los aminoácidos a partir del 416, es muy variable, con identidades del 36 al 60% Méndez-Toss (2000). Se ha sugerido que esta región de la proteína es importante para las primeras interacciones de HAstV con su célula huésped Krishna (2005). La existencia de anticuerpos con actividad neutralizantes dirigidos contra esta región Bass (1997) concuerdan con esta hipótesis. Dentro de este dominio hay una zona rica en aminoácidos ácidos (aproximadamente entre los aminoácidos 649 y 702) (figura 3) que se encuentra conservada en sus propiedades ácidas, aunque no en secuencia, entre todos los AstV Méndez (2004) y posee motivos similares a aquellos que son reconocidos y procesados por caspasas, (figura 3), que son enzimas proteolíticas importantes en el proceso de muerte celular por apoptosis. La importancia de estas enzimas en el ciclo de replicación de los HAstV se describirá más adelante Méndez (2004).

En la parte central de VP90, se han identificado sitios susceptibles al corte por tripsina Méndez (2002) (figura 3) que se encuentran conservados entre varias cepas de AstV, humanos y animales, y que, en el caso de virus de origen humano, son necesarios para la infección Méndez (2002).

3.- Ciclo Replicativo de HAsV

El proceso de entrada de HAsV estudiado en células de embrión humano (HEK-293) se lleva a cabo por endocitosis mediada por clatrina y depende del pH ^{Donelli (1992)}. Recientemente, en nuestro laboratorio encontramos que HAsV-8 también entra a células CaCo-2 por un proceso mediado por clatrina. Este proceso se inhibe por drogas que afectan la endocitosis a diferentes niveles tales como la clorpormacina (que impide el ensamblaje de clatrina), por brefeldina A (que afecta la estructura del aparato de Golgi impidiendo la maduración de los endosomas) y bafilomicina-A1 (que impide la acidificación de endosomas bloqueando a la ATPasa endosomal). También se observó que la infección se inhibe tanto por la expresión de mutantes dominantes negativas de Eps15 (que recluta a las “jaulas” de clatrina que se forman durante la endocitosis) y de dinamina (que participa en la escisión de las vesículas de la membrana celular), como por el bloqueo de la expresión de la cadena pesada de clatrina utilizando siRNAs. A la fecha, no se sabe qué otras moléculas celulares participan tanto en la unión como en la entrada y desnudamiento del virus.

El RNA viral, por ser de polaridad positiva, actúa como RNA mensajero para la producción de las proteínas no estructurales nsP1a y nsP1a/1b y aunque se sintetizan desde que el RNA viral se libera de la cápside, estas, se pueden detectar a partir de las 4 horas post-infección ^{Méndez (2003)}. Las proteínas nsp1a y nsp1ab se procesan proteolíticamente por al menos una proteasa celular de manera cotraduccional en el residuo 170 por lo que no se pueden detectar como productos completos de la traducción. Se piensa que la serin-proteasa viral es responsable del resto del procesamiento, aunque solo se ha identificado cortes en los aminoácidos 410 y 655 como dependientes del corte por esta proteasa ^{Geigenmuller (2002b), Méndez (2003)}.

Las proteínas no estructurales forman los complejos de replicación, probablemente en asociación con proteínas celulares, que son responsables de generar moléculas de RNA de cadena negativa del tamaño del genoma ^{Geigenmüller (2003)}. A partir de este RNA antisentido, se generan dos moléculas de RNA de diferente tamaño (figura 4): el RNA genómico (7 kb), que incluye los tres marcos de lectura, y un RNA sub-genómico (2.4 kb), que contiene al ORF2 que codifica a las proteínas estructurales ^{Geigenmüller (2003)}. Ambos RNAs se encuentran flanqueados por pequeñas regiones no traducidas.

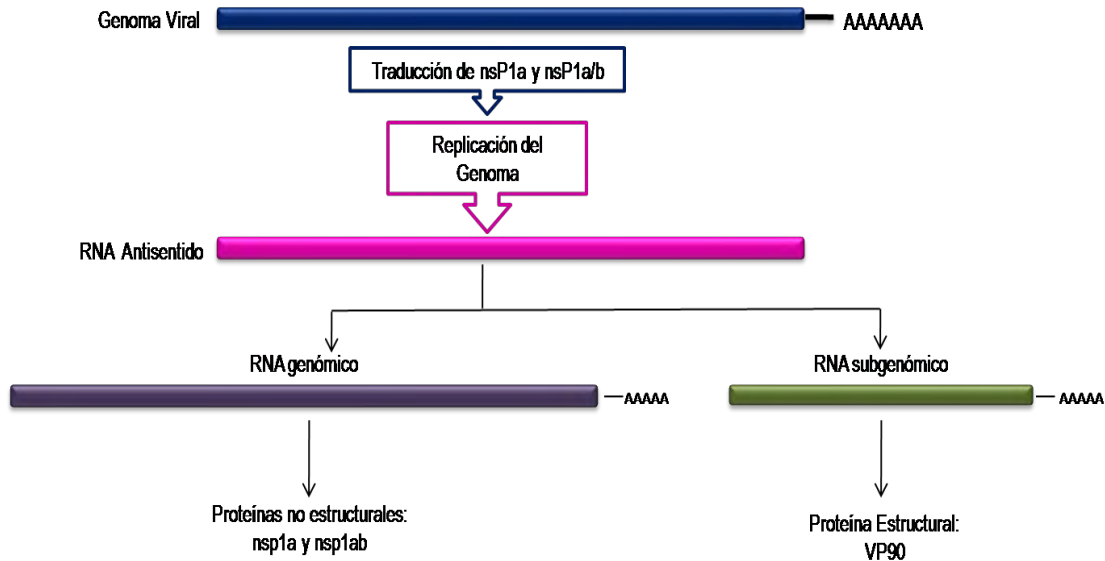


Figura 4.- Replicación del genoma de HAstV. El genoma de los *Astrovirus* es una molécula de RNA de cadena sencilla con polaridad positiva que posee una cola poliadenilada, estas características permiten que el genoma del virus sea utilizado como RNA mensajero por la maquinaria celular. El genoma viral se traduce y origina a las proteínas no estructurales nsP1a y nsP1ab, las cuales se autoprocetan por su dominio proteasa generando una RNA polimerasa dependiente de RNA que replica el genoma viral dando origen al RNA anti-sentido. Este RNA anti-sentido se utiliza como molde para generar dos moléculas más de RNA: el RNA genómico y el RNA subgenómico, el primero se utiliza para la producción de proteínas no estructurales y para la producción del genoma de la progenie viral y, el segundo, para la síntesis de las proteínas estructurales que forman la cápside del virión.

Estas dos especies de RNA son colineales en su extremo 3' y pueden observarse a partir de 4 hpi en células Caco-2 y de las 12 hpi en células LLC-MK2 infectadas con HAstV-2, lo cual parece depender de la multiplicidad de infección Méndez (2007). El RNA genómico se utiliza para la traducción de las proteínas no estructurales y, posteriormente se ensambla en partículas, mientras que el RNA subgenómico se utiliza para la traducción de VP90 (figura 4) Geigenmüller (2003).

La replicación del genoma y el ensamble inicial de los virus ocurre en estructuras celulares en forma de vesículas (figura 5). La proteína VP90 se ensambla en estas estructuras generando partículas asociadas a la membrana (^mVP90) de manera transitoria, probablemente a través de su extremo C-terminal. Estas partículas parecen estar dentro de las vesículas o asociadas en las membranas ya que son resistentes a la digestión con proteasas. Al separarse de estas membranas por un mecanismo aun desconocido, la VP90 de las partículas citosólicas (^cVP90) se procesa proteolíticamente en su extremo C-terminal para generar partículas compuestas por la proteína VP70. Este procesamiento está relacionado con la liberación de las partículas virales de su célula huésped, ya que las formadas por VP90 sin procesar permanecen dentro de la célula.

Durante la infección por astrovirus, se induce la activación de proteasas celulares involucradas en la muerte celular por apoptosis, denominadas caspasas, las cuales son responsables de los cortes de VP90 para dar origen a la VP70. El papel de las caspasas en el procesamiento de VP90 se confirmó por experimentos con agentes que modulan su activación. En presencia del inhibidor de caspasas Z-VAD, el procesamiento de VP90 a VP70 se bloquea, obteniendo partículas virales formadas por VP90 que se encuentran principalmente en la fracción celular del cultivo Méndez (2004). Si la infección se da en presencia del inductor de apoptosis celular por receptores de muerte, TRAIL, este procesamiento aumenta, generándose una mayor cantidad de partículas virales formadas por VP70 que se encuentran principalmente en el sobrenadante Méndez (2004). Experimentos in vitro han demostrado que las caspasas son responsables del corte de VP90 para generar VP70 y el sitio de corte se localiza en el motivo TYVD₆₅₇ Baños (2010). Este corte se ha asociado con la liberación de las partículas virales, de manera que solo las que están compuestas por VP70 se encuentran fuera de la célula, en donde estas son procesadas por tripsina generando partículas infecciosas cuyas cápsides se componen de tres productos de aproximadamente 34, 27 y 25 kDa (VP34, VP27 y VP25 respectivamente) (figura 5).

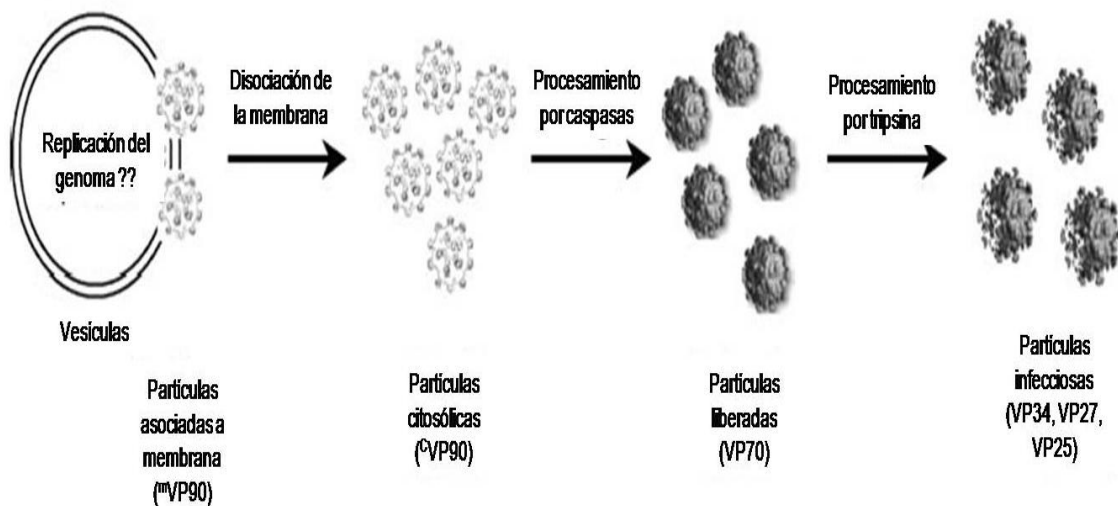


Figura 5.- Modelo de la morfogénesis de *Astrovirus*. La replicación del genoma y el ensamble de la progenie viral parecen suceder al mismo tiempo dentro de vesículas citoplasmáticas. Las primeras partículas en ensamblarse se forman de una VP90 que permanece asociada a membranas (mVP90), estas partículas se liberan de la membrana. Las proteasas celulares procesan la cVP90 presente en las partículas citosólicas en su C-terminal generando partículas virales formadas por VP70 capaces de salir al medio extracelular. La tripsina contenida en el medio extracelular procesa las partículas generando virus infeccioso formado de VP35, VP27 y VP25. Imagen modificada de Méndez (2007).

En un huésped, la tripsina que se encuentra en el lumen intestinal favorece la infección, mientras que la infección de los enterocitos en cultivos celulares requiere de un pretratamiento del virus con tripsina exógena. En este procesamiento, se presentan cambios estructurales, que se detectan por una reactividad diferencial con diferentes anticuerpos monoclonales ^{Bass (2000)} y por su sensibilidad a la misma proteasa ^{Méndez (2002)}, que parecen ser importantes para la entrada del virus. En HAstV-8, se ha encontrado que este procesamiento es secuencial de manera que se producen varias proteínas intermediarias. Méndez y colaboradores ^{Méndez (2002)}, mostraron que el primer corte de VP70 se da en el residuo Arg₃₉₃ (figura 6) generando dos productos de 41 y 28 KDa (VP41 y VP28, respectivamente). Posteriormente VP41 es procesado en su carboxilo terminal para dar origen a un producto final de 34 kDa (VP34) (figura 6) ^{Méndez (2002)}, mientras que VP28 es procesado tanto en su carboxilo terminal como en el amino terminal para dar origen a dos productos finales de 27 y 25 KDa (VP27 y VP25, respectivamente) que parecen compartir su carboxilo terminal (figura 6) ^{Méndez (2002)}.

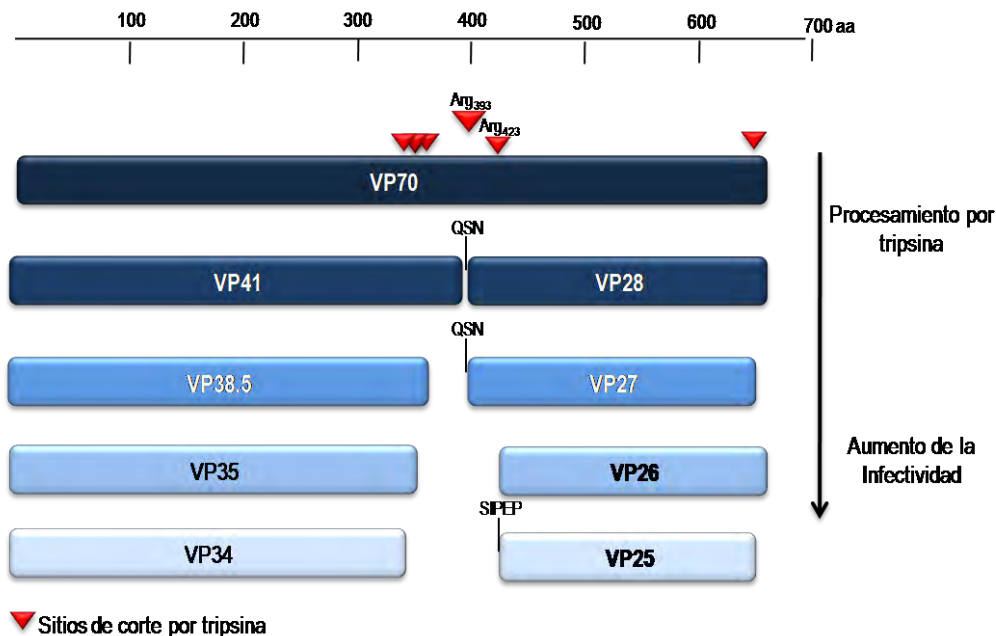


Figura 6.- Procesamiento de la proteína VP70 por tripsina. La proteína VP70 es procesada por la tripsina en la Arg393 dando origen a dos productos de 41 y 28 kDa (VP41 y VP28 respectivamente). VP41 es procesado en el carboxilo terminal generando productos intermedios de 38.5 y 35 kDa (VP38.5 y VP35 respectivamente) y un producto final de 34 kDa (VP34). Al mismo tiempo VP28 es procesado en su carboxilo terminal originando un intermedio de 27 kDa (VP27), que posteriormente es procesado en su amino-terminal (Arg₄₂₃) generando un intermedio de 26 kDa (VP26) y un producto final de 25 kDa (VP25). La aparición de estos intermedios correlaciona con el aumento de infectividad del virus, siendo las partículas de mayor infectividad aquellas formadas por los productos VP34, VP27 y VP25.

La aparición de los diferentes intermediarios de este procesamiento correlaciona con el aumento de la infectividad del virus; las partículas formadas por los productos finales VP34, VP27 y VP25 son hasta 100 veces más reactivas con respecto a las que están formadas por VP70 (figura 6) Méndez (2002). Las partículas procesadas son las que inician un nuevo ciclo de replicación viral. Cuando las partículas están formadas por la proteína VP90, el procesamiento inicial parece ocurrir en la parte central de la proteína generando VP41 y una proteína de aproximadamente 50 kDa, que posteriormente se procesa en su carboxilo terminal para generar las proteínas VP27 y VP25.

II. Justificación

A pesar de que los Astrovirus humanos son una de las causas principales de gastroenteritis viral en niños, adultos mayores y personas inmunocomprometidas, hay muchos aspectos de su biología, tanto moleculares como relacionados con su patogenicidad, que no se conocen. Por ejemplo, no se han identificado los receptores ni las moléculas celulares que participan en la entrada a su célula huésped; no se conocen aspectos de su ensamblaje ni morfogénesis, ni las proteínas celulares importantes en estos eventos. El uso de sistemas de expresión heteróloga eficientes como el sistema de baculovirus/células de insecto permite obtener cantidades considerables de proteína viral de manera soluble o formando VLPs, en el caso de proteínas estructurales de virus icosaédricos, lo cual es uno de nuestros principales intereses. La obtención de este tipo de partículas ha sido de utilidad para estudiar algunos de los aspectos antes mencionados. De esta manera, en el presente trabajo se pretendió expresar la proteína VP90 de HAstV-8 tanto de manera independiente como fusionada a la proteína verde fluorescente (GFP del Inglés “Green Fluorescent Protein”) y caracterizarlas.

III. Hipótesis

La proteína estructural de *Astrovirus* expresada en células de insecto por baculovirus recombinante se ensamblará de manera similar a la proteína encontrada en los viriones de HAstV-8, por lo cual se podría utilizar como modelo en estudios de entrada y ensamblaje del virus.

IV. Objetivos

1.- Objetivo General

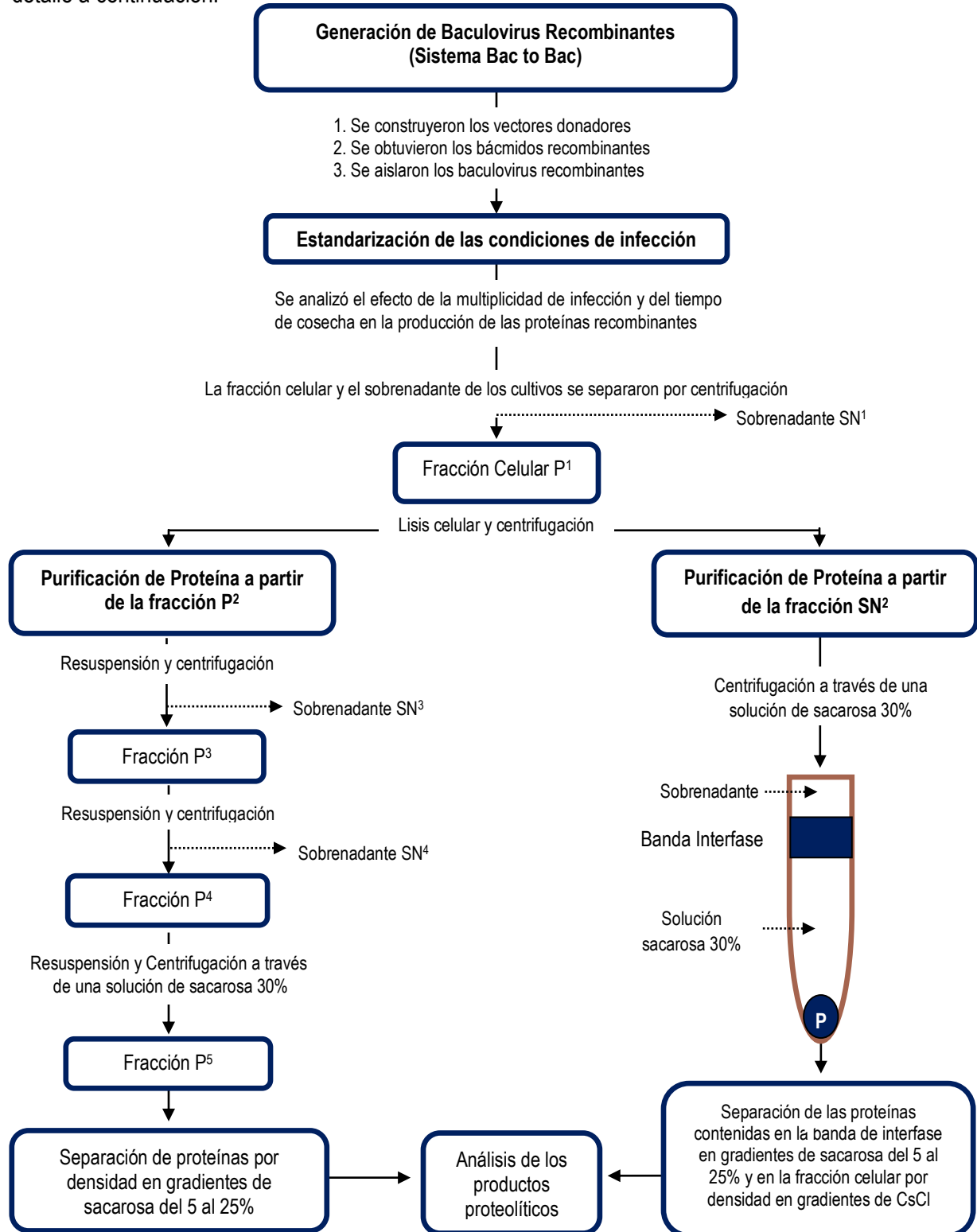
Producir baculovirus recombinantes que expresen la proteína estructural de HAstV-8 VP90 de manera individual y como producto de fusión con la proteína verde fluorescente.

2.- Objetivos Particulares

- a) Generar baculovirus recombinantes que expresen la proteína VP90 y GFP/VP90.
- b) Optimizar la producción de estas proteínas y su purificación.
- c) Analizar el procesamiento de las proteínas recombinantes por digestión con tripsina.

V. Metodología

El esquema describe brevemente la metodología utilizada, la cual se mencionara con mayor detalle a continuación.



1.- Células de Insecto sf9

Para la propagación de los baculovirus recombinantes y la producción de las proteínas de interés se utilizaron células derivadas de tejido ovárico de la pupa de *Spodoptera frugiperda* (células sf9). Las células se mantuvieron en suspensión con agitación constante de 115 rpm, en medio sf-900 II SFM (del Inglés "Serum Free Medium", Gibco) sin antibióticos a 27°C. Los pases se hicieron cada tercer día, iniciando el nuevo pase con 0.7×10^6 células/ml en cultivos de 15 ó 30 ml. De esta manera, los cultivos se mantuvieron con más del 95% de viabilidad.

2.- Construcción de los Baculovirus Recombinantes

Para generar los baculovirus recombinantes, se utilizó el sistema Bac to Bac® de Invitrogen. Este sistema consiste en clonar el gen de interés en un vector donador, que se utiliza para transformar bacterias que contienen el genoma completo de Baculovirus en un báculo. Por medio de recombinación homóloga el báculo adquiere el gen de interés y se utiliza para transfectar células de insecto, de donde finalmente se obtienen los baculovirus recombinantes que expresan la proteína deseada.

2.1.- Construcción de los Vectores Donadores

El gen de VP90 de HAstV-8 se obtuvo del plásmido polyEMC-ORF2C (6.3 kb) construido en el laboratorio extrayéndolo con las enzimas Pst I y Sal I. Este fragmento se clonó en el vector pFastBac, utilizando las mismas enzimas, bajo el promotor del gen de la poliedrina de baculovirus. La identidad de las clonas pFastBac-VP90 obtenidas se comprobó por digestiones con las enzimas de restricción Pst I-Sal I y Msc I-Nde I. Para generar el vector pFastBac-GFP/VP90 se utilizaron los plásmidos pFastBac-VP90 y el pQBI25 (Quiagen) que contiene el gen de GFP. El gen de GFP se obtuvo por PCR a partir del vector pQBI25 utilizando los oligonucleótidos 5'-TAC ATG GCT AGC GCT AGC AAA GGA G-3' y 5'-ACT ATG AGC TCT GTT GTA CAG T-3', que incluyen los sitios de restricción para las enzimas Nhe I y Sac I, los cuales se utilizaron para introducir este gen cerca del extremo 3' del ORF2 en el vector pFastBac-VP90. La identidad del plásmido se comprobó por digestión con las enzimas Nhe I-Sac I y Pml I-Nae I, obteniendo los fragmentos esperados de 4.2 y 3.6 Kb, respectivamente.

2.2.-Obtención de los Búcmidos Recombinantes

Los vectores donadores pFastBac-VP90 y pFastBac-GFP/VP90 se utilizaron para transformar bacterias E.coli DH10Bac, que contienen el genoma completo de baculovirus en forma de búcmido. Las bacterias se sembraron en placas con medio terrific sólido con 50 µg/ml de kanamicina, 7 µg/ml de gentamicina y 10 µg/ml de tetraciclina. Al día siguiente se aislaron las colonias y se inocularon 5ml de medio Terrific líquido con los antibióticos antes mencionados, incubando toda la noche. Para extraer los búcmidos recombinantes se utilizó el protocolo "Isolating Recombinant Bacmid DNA" del manual Bac to Bac de Invitrogen, para lo cual los cultivos se centrifugaron a velocidad máxima en una centrífuga eppendorff durante un minuto y se descartaron los sobrenadantes. Las pastillas se resuspendieron en 300 µl de la solución I (Tris HCl 15 mM pH 8, EDTA 10 mM, 100 µg/ml de RNasa A) y se mezclaron suavemente. Se agregaron 300 µl de la solución II (NaOH 0.2 M, 1% SDS) y se incubaron a temperatura ambiente por 5 min. Suavemente se agregaron 300 µl de Acetato de Potasio pH 5.5 y se incubaron en hielo por 10 min. Se centrifugó a velocidad máxima durante 10 minutos, se recuperó el sobrenadante en un tubo eppendorff que contenía 800 µl de isopropanol se mezcló y se incubó en hielo por 10 minutos. Nuevamente se centrifugó a máxima velocidad durante 15 minutos y se descartó el sobrenadante. La pastilla se lavó con 500 µl de etanol al 70% y se resuspendió en 40 µl de agua agitando suavemente. El búcmido se guardó a 4°C hasta su uso.

2.3.-Baculovirus Recombinantes

Se sembraron cajas de seis pozos con 1×10^6 células sf9/pozo y se dejaron adherir durante una hora a 27°C. Se hicieron mezclas de cada uno de los búcmidos con Cellfectin (Gibco) con una proporción 1:10 y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. En cada pozo se agregó 300 µl cada una de las mezclas y se incubó de manera independiente durante 16 horas a 27°C. El medio de cultivo se sustituyó por medio fresco sf900 y los cultivos se incubaron a 27°C durante 3 días. A este tiempo, el virus presente en el sobrenadante se recuperó y se confirmó la expresión de las construcciones sobre las células adheridas por medio de inmunoensayos y fluorescencia (para el caso de Bac -GFP/VP90).

3.- Estandarización de las Condiciones de Infección

3.1- Infecciones

Se sembraron cajas de 12 pozos con 5×10^5 células sf9/pozo y se incubaron durante una hora a 27°C para que las células se adhirieran. Cada pozo se inoculó con 300 μ l de los virus Bac-VP90 y Bac-GFP/VP90 con diferentes multiplicidades (0.1, 1 y 1 MOI) dejando pozos control sin infectar. La adsorción se dejó durante una hora a 27°C y se cambió el inoculo por medio fresco sf900. Se cosecharon las células de cada pozo a diferentes tiempos: 24, 48, 72 y 96 hpi, separando la fracción del sobrenadante de la fracción celular por medio de centrifugación (1200 rpm durante 5 minutos en una centrifuga eppendorff). El sobrenadante SN¹ se guardó a 4°C y la pastilla P¹ a -20°C hasta su uso.

3.2- Análisis de Proteína Viral por Inmunoensayos

a) Procesamiento de las Pastillas:

La pastilla P¹ se descongeló y resuspendió en 500 μ l de buffer TNM 1X (Tris 50 mM pH7, NaCl 0.1M, MgSO₄ 20 mM) con inhibidor de proteasas (Complete). Las células se rompieron con tres ciclos de congelación/descongelación y se centrifugaron a 1500 rpm en una centrifuga eppendorff durante 10 minutos a 4°C, generando el sobrenadante SN² y la pastilla P² para analizar las proteínas por *western blot*.

b) Western Blot:

Las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida al 7.5%, utilizando como gel concentrador acrilamida al 4%. La electroforesis se hizo en buffer tris-glicina a 60 volts (gel concentrador) y 120 volts (gel separador) durante 2 horas. La transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa se hizo en buffer CAPS durante 45 minutos a 50 volts. La membrana se bloqueó con leche al 5% en TBS-T (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, Tween 20 al 0.1%) durante una hora a temperatura ambiente. La incubación con el anticuerpo primario se hizo en TBS-T con 5% de leche durante toda la noche a 4°C utilizando el anticuerpo policlonal anti-Yuc a una dilución 1:5000. Al día siguiente las membranas se lavaron con TBS-T y se incubaron una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario (anti-conejo acoplado a peroxidasa de rábano (1:2500)) en TBS-T con 5% de leche. Las membranas se lavaron y revelaron por medio de quimioluminiscencia utilizando luminol (Dupont).

4.- Purificación de la Proteína

Se utilizaron cultivos en suspensión de células sf9. Se sembraron células sf9 en matraces erlenmeyer de 50 ml con 1×10^6 células/ml (30 ml en total) y, simultáneamente, se agregaron los virus Bac-VP90 ó Bac-GFP/VP90 a una multiplicidad de infección de 1. La infección se dejó transcurrir durante 72 a 27°C. Los cultivos se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 min y se separó el sobrenadante de la fracción celular. Los sobrenadantes se guardaron a 4°C protegidos de la luz y la fracción celular se congeló a -20°C hasta su uso.

4.1.- Purificación de la Proteína Contendida en la Fracción Celular

La proteína contenida en la fracción celular se purificó con base en el protocolo reportado previamente por Bonaparte y colaboradores ^{Bonaparte (2008)}. Con respecto al volumen de las pastillas, estas se resuspendieron en dos volúmenes del buffer TNE (Tris 50 mM pH7, NaCl 0.1M, EDTA 10mM) con inhibidor de proteasas y se lisaron con tres ciclos de congelación/descongelación. Se centrifugó durante 10 minutos a 13,300xg en una centrífuga eppendorff a 4°C y se separaron los sobrenadantes (SN²). Las pastillas se resuspendieron en 1 ml de buffer TNE con el 2% de NP-40 y se incubaron en hielo por 30 minutos. Nuevamente se centrifugaron y se desecharon los sobrenadantes. Las pastillas se resuspendieron en 1 ml del buffer TNM con 2 µl de 10 mg/ml de DNasa I y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se repitió la centrifugación a 13,000xg y se desecho el sobrenadante. Las pastillas resultantes se resuspendieron en 1 ml del buffer TNE con inhibidores de proteasas y se centrifugaron a través de una solución de sacarosa al 30% a 234,000xg (rotor SW 55Ti, Beckman) durante 1 hora a 4°C. Los sobrenadantes se desecharon y las pastillas se resuspendieron en 500 µl del buffer de disociación (Tris 100 mM pH 8, NaCl 0.5M, Urea 100 mM, EDTA 10 mM, Ditiotreitól 5 mM) utilizando una jeringa y se incubaron a -20°C durante toda la noche. Las pastillas se descongelaron y se separaron en gradientes continuos de sacarosa 5-25% hechos en el buffer de disociación en ausencia de inhibidores de proteasas. Los gradientes se prepararon un día antes congelando después de agregar cada fase del gradiente. Los gradientes se centrifugaron a 274,000xg (rotor SW 55Ti, Beckman) por 10 horas a 4°C. Se recuperaron fracciones de aproximadamente 350 µl y se analizó el contenido proteico en cada una de ellas por *western blot*.

4.2.- Purificación de la Proteína Contendida en el Sobrenadante

La proteína de interés se purificó a partir del sobrenadante (SN²) resultante de la lisis celular después de los tres ciclos de congelación/descongelación descritos en la sección anterior. Los sobrenadantes se centrifugaron a través de 5 ml de una solución de sacarosa al 30% a 234,000xg (rotor SW 55Ti, Beckman) durante 1 hora a 4°C. En cada caso, se recuperó la banda de la interfase (entre el sobrenadante y la sacarosa) y la pastilla. Las bandas recuperadas se colocaron sobre gradientes continuos de sacarosa 5-25% y se centrifugó a 274,000xg (rotor SW 55Ti, Beckman) por 10 horas a 4°C. Como existía la posibilidad de que se hubieran formado VLPs, la pastilla obtenida se resuspendió y se colocó sobre una solución de CsCl 1.235 M y se centrifugó a 45,000 rpm durante 16 horas a 4°C, para purificar VLPs con base en su densidad.

VI. Resultados

1.- Generación de los Baculovirus Recombinantes

Para generar los baculovirus recombinantes que expresaran a la proteína VP90 de HAstV-8 y a la proteína de fusión GFP/VP90, se utilizó el sistema de expresión Bac to Bac de Invitrogen descrito en la metodología. Como primer paso se construyó el vector donador pFastBac-VP90 a partir del plásmido pFastBac (4.775 Kb) y del plásmido polyEMC II-ORF2C (6.306 Kb) (Figura 7), que contiene el gen de la proteína estructural VP90 de HAstV-8.

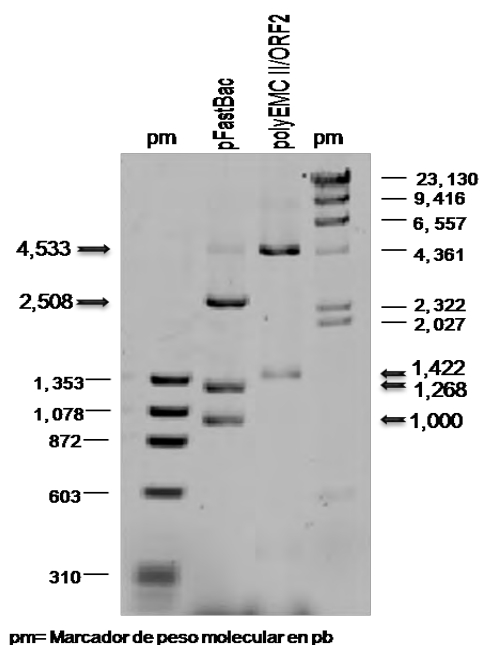


Figura 7.- Identidad de los vectores pFastBac (4.775 Kb) y polyEMC II-ORF2C (6.306 Kb). La comprobación se hizo por medio de la digestión con la enzima Bgl I. Se obtuvieron tres fragmentos para pFastBac de 2508, 1268 y 1000 pb y tres para polyEMC II-ORF2C de 4533, 1422 y 351 pb (flechas negras). Los productos de la digestión se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% y se tiñeron con bromuro de etidio.

El gen de la proteína VP90 se obtuvo por digestión con las enzimas Pst I y Sal I, estos mismos sitios se utilizaron para clonar el gen en el vector pFastBac. La identidad del plásmido resultante se comprobó por digestión con las enzimas de restricción antes mencionadas y con las enzimas Msc I y Nde I. La digestión con las primeras enzimas resultó en dos fragmentos con tamaños de 4775 kpb (vector pFastBac vacío) y 2800 kpb (gen de VP90), mientras que la digestión con las enzimas Nde I y Msc I generó fragmentos de 4052 y 336 kpb, el tamaño de los fragmentos se predijeron por medio de análisis *in silico* (figura 8).

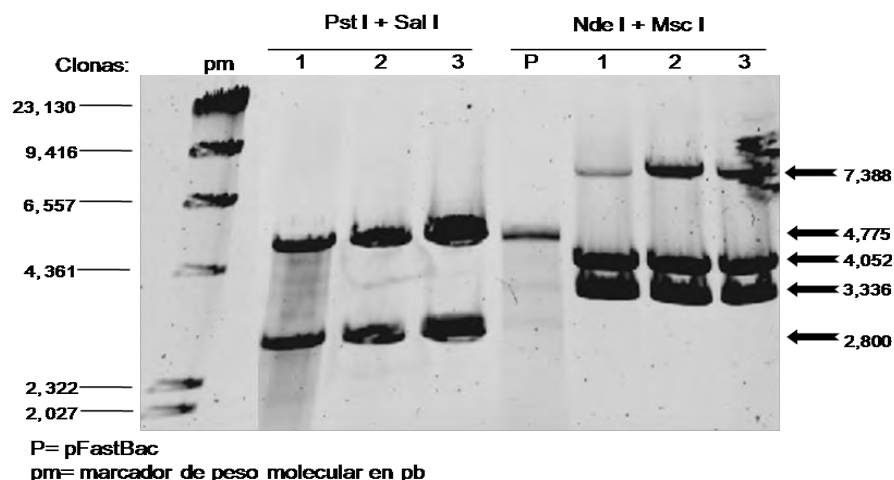


Figura 8.- Análisis por restricción enzimática de la construcción pFastBac-VP90. Se obtuvieron tres clonas (1-3) y la identidad de cada una de ellas se comprobó por digestión doble utilizando las enzimas Pst I - Sal I y Nde I - Msc I. Los tamaños de los productos de la digestión se indican con flechas negras. Las muestras se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio.

Para la construcción del plásmido pFastBac-GFP/VP90, el gen de la GFP (obtenido por PCR a partir del plásmido plásmido pQBI25) se clonó en el plásmido pFastBac-VP90 utilizando los sitios de restricción Nhe I y Sac I, con lo que utilizando estos sitios, los aminoácidos del 7 al 36 de VP90 serán reemplazados por la proteína GFP. La identidad de la construcción resultante se comprobó por digestión con las enzimas de restricción antes mencionadas y con las enzimas Pml I y Nae I (figura 9).

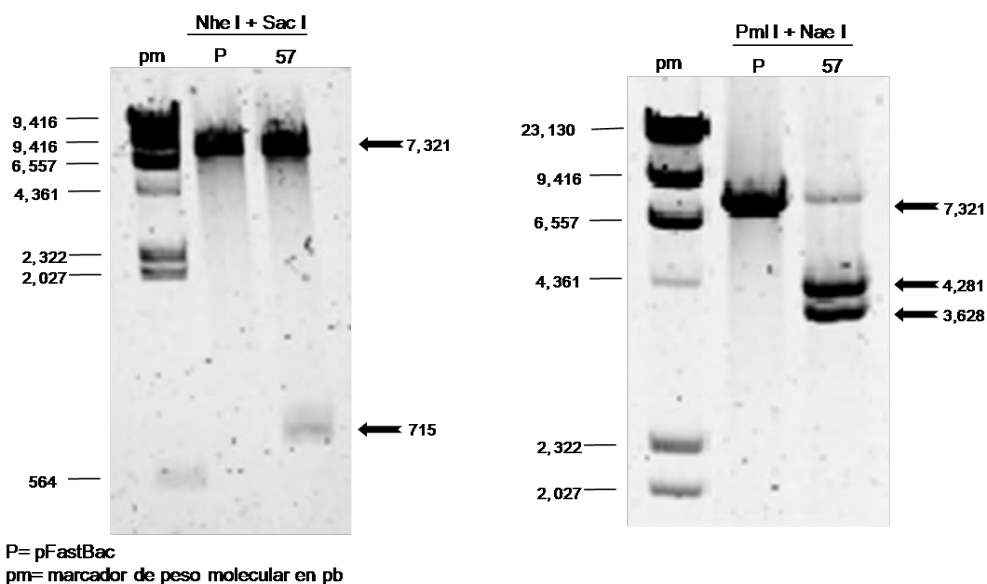


Figura 9.- Análisis por restricción enzimática de la construcción pFastBac-GFP/VP90. El plásmido pFastBac-GFP/VP90 se generó a partir del plásmido pFastBac-VP90 y del pQBI25, la construcción se amplificó en bacterias XL1-Blue. Se obtuvo una clona (57) y la identidad del plásmido se comprobó con dos digestiones dobles utilizando las enzimas Nhe I - Sac I y Pml I - Nae I. Las muestras se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio.

Con las construcciones pFastBac-VP90 y pFastBac-GFP/VP90 se transformaron bacterias DH10-Bac por electroporación, con la finalidad de obtener los b acmidos recombinantes y posteriormente transfectarlos en células sf9 para generar los baculovirus recombinantes. Para comprobar la presencia de baculovirus recombinantes, tres días después de la transfección en sf9, se recuperó el sobrenadante de los cultivos de manera individual y las células adheridas se fijaron con acetona al 80% en PBS y se analizaron por medio de un ensayo de inmunoperoxidasa (Figura 10). Para este ensayo se utilizó un suero dirigido contra HAstV-8 como anticuerpo primario, el cual se generó contra partículas purificadas formadas por la proteína VP70, por lo que no se espera que reconozca el carboxilo terminal de la proteína VP90. A partir de la transfección con el bacmido-VP90 se obtuvo un cultivo positivo por inmunoperoxidasa utilizando el anti-HAstV8, mientras que después de transfectar el bacmido-GFP/VP90 se obtuvieron 6 cultivos positivos (Figura 10). Estas 6 clonas de Bac-GFP/VP90 no solo fueron positivas al ensayo de inmunoperoxidasa sino también fueron positivas por fluorescencia, indicando que la proteína de fusión era funcional (figura 10). La clona 6 se utilizó en experimentos posteriores.

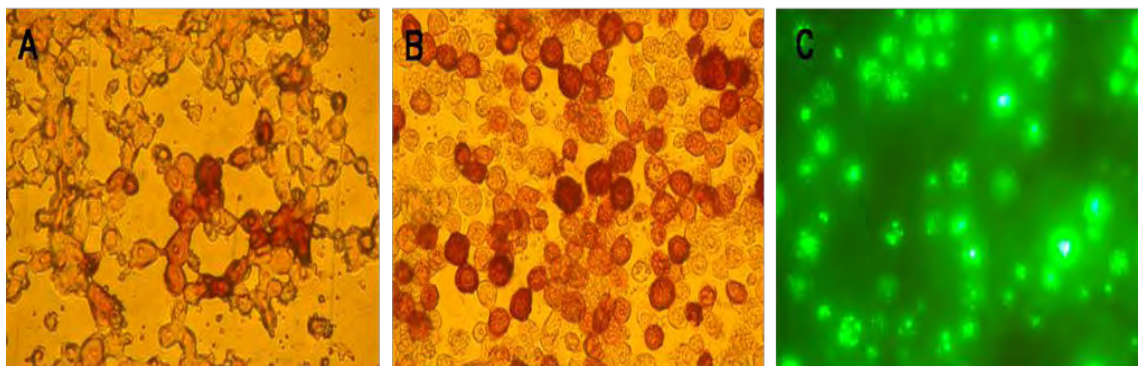


Figura 10.- Expresión de las proteínas VP90 y GFP/VP90 por baculovirus recombinantes. Las células sf9 se transfectaron con los b acmidos VP90 (A) y GFP/VP90 (B y C). A los tres días después de la transfección, las células se fijaron y tiñieron por inmunoperoxidasa utilizando el anticuerpo dirigido contra HAstV-8 como anticuerpo primario (A y B) y se observaron en un microscopio de epifluorescencia (C).

2.- Estandarización de las Condiciones de Infección

En el sistema de expresión heteróloga utilizando cultivos de células sf9 infectados con baculovirus recombinantes, las proteínas pueden ser secretadas al medio externo o quedarse asociadas a la fracción celular (Bac to Bac System Manual, Invitrogen). Para determinar cuál era el caso de la proteína GFP/VP90 se realizó un análisis proteico tanto del sobrenadante como de la fracción celular de un cultivo de células sf9 infectadas con el baculovirus Bac-GFP/VP90 (Figura 11). Para estos experimentos de estandarización solo se trabajo con este baculovirus por ser fácilmente visible debido a la

fluorescencia emitida por la proteína. El cultivo se infectó con una multiplicidad de infección de 1 y se incubó durante 72 horas. El sobrenadante y la fracción celular se separaron por centrifugación y se analizó la presencia de la proteína de astrovirus por *western blot* utilizando como anticuerpo primario el suero dirigido contra HAstV-8 (Figura 11). Se observó que la proteína GFP/VP90 no es secretada al medio extracelular sino que permanece asociada a la fracción celular (figura11). En este análisis, se observaron principalmente tres bandas de aproximadamente 120, 85 y 48 kDa, que por su tamaño podrían corresponder a la proteína GFP/VP90 (~120 kDa), a la proteína VP90 sin GFP (~85 kDa) y a un producto del procesamiento proteolítico intracelular de esta proteína (~48 kDa) (Figura 11). Las identidades de estos productos se analizaron y se describirán posteriormente.

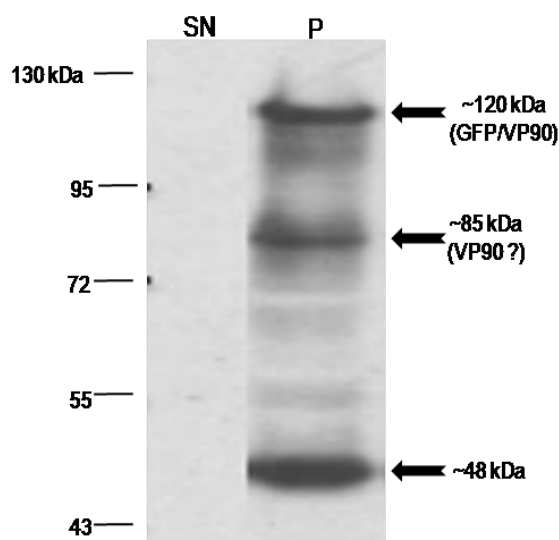


Figura 11.- Análisis de la presencia de la proteína recombinante GFP/VP90 en la fracción del sobrenadante y en la fracción celular. Células sf9 infectadas con baculovirus GFP/VP90 a una multiplicidad de infección de 1 MOI. A las 72 horas después de la infección se cosecharon el sobrenadante (SN) y la fracción celular (P) por separado y se analizaron por inmunoblot con anticuerpos dirigidos contra HAstV-8.

La producción de proteínas en este sistema depende de factores como la multiplicidad de infección y el tiempo de cosecha, entre otros (Bac to Bac System Manual, Invitrogen). En estudio previos expresando la proteína estructural de HAstV-1 no se habían analizado los parámetros óptimos para su producción Caballero (2004), Moser (2007), Bonaparte (2008), por lo que se analizó el efecto de la multiplicidad de infección (Figura 12) y del tiempo de cosecha (Figura 13) en cultivos de células sf9 en monocapa a una misma densidad. También determinamos si estas variables influían en el procesamiento proteolítico observado previamente en la figura 11.

Para probar diferentes condiciones de infección variando la multiplicidad de infección (Figura 12), se infectaron los cultivos con el baculovirus Bac-GFP/VP90 utilizando multiplicidades de infección de 0.1, 1, 5 y 10, y se incubaron durante 72 horas. Se separó la fracción celular por centrifugación y se analizó la proteína viral por *western blot* utilizando como anticuerpo dirigido contra HAstV-8 (figura 12). En este ensayo se identificaron principalmente tres bandas de ~120, ~60 y ~48 kDa en las cuatro condiciones, lo que indica que el procesamiento intracelular de la proteína no depende de la multiplicidad de infección (Figura 12). A diferencia del ensayo anterior, la banda de ~85 kDa, se observó menos intensa y únicamente en las multiplicidades de infección de 1 y 5; y adicionalmente se detectó una banda intensa de ~60 kDa. Como se mencionó anteriormente, la banda de ~120kDa podría corresponder a la proteína GFP/VP90, la banda de ~85 kDa a la proteína VP90 sin GFP y las de ~60 y ~48 kDa a productos de procesamiento proteolítico. Comparando las bandas obtenidas a las diferentes multiplicidades, se puede observar que la intensidad de estas a una multiplicidad de 0.1 fue ligeramente menor que las observadas en las multiplicidades de 1, 5 y 10, en las cuales se ve poca variación entre la intensidad de las bandas, con la excepción de la banda de 85 kDa que no se detectó a una multiplicidad de infección de 10. La intensidad de las bandas de 120 kDa parece no variar, por lo que este parámetro parece tener poco efecto sobre la cantidad de GFP/VP90 producida. Por estas observaciones se decidió utilizar la multiplicidad de 1 en subsecuentes experimentos (Figura 12).

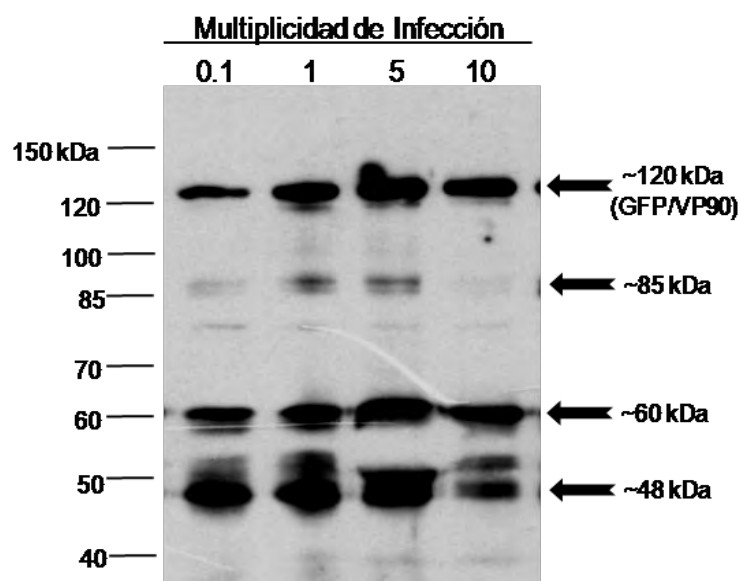


Figura 12.- Efecto de la Multiplicidad de Infección en la producción de la proteína GFP/VP90. Los cultivos en monocapa de células sf9 se infectaron con el baculovirus Bac-GFP/VP90 con multiplicidades de infección de 0.1, 1, 5 y 10. A las 72 horas después de la infección y se analizó la proteína viral presente en la fracción celular por *immunoblot* utilizando el anticuerpo dirigido contra HAstV-8.

Para determinar el efecto del tiempo de cosecha sobre la concentración y el procesamiento de la proteína GFP/VP90, se infectaron los cultivos con el baculovirus Bac-GFP/VP90 a una multiplicidad de 1 y se cosecharon a cuatro diferentes tiempos: 24, 48, 72 y 96 horas post-infección (hpi) (figura 13). La detección de las proteínas virales se observó a partir de las 48 hpi (figura 13) y su expresión incrementó en intensidad en relación al tiempo de cosecha, siendo la mayor intensidad a las 96 hpi. En cuanto a la integridad de la proteína, se detectaron las mismas bandas de ~120, ~85, ~60 y ~48 kDa (figura 13).

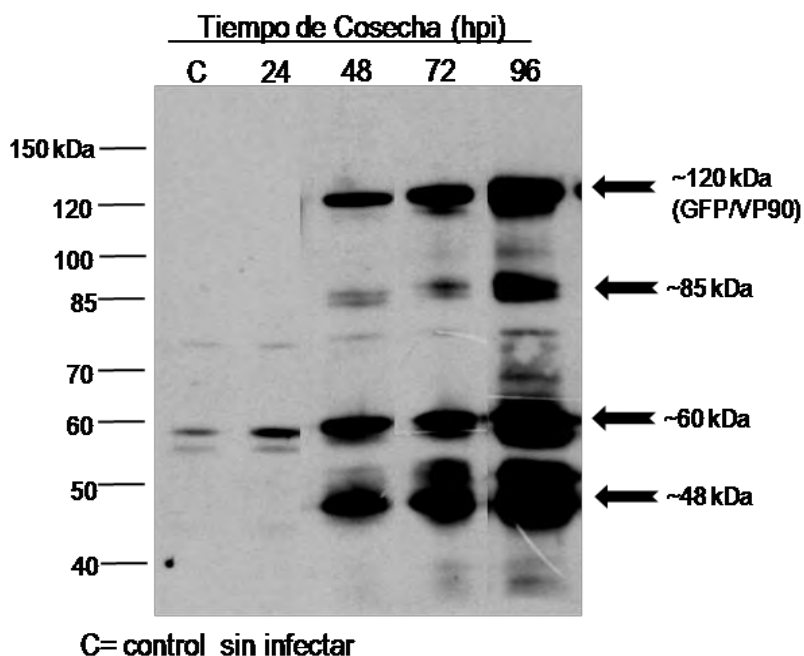


Figura 13.- Efecto del tiempo de cosecha sobre la producción de la proteína GFP/VP90. Los cultivos en monocapa de células sf9 se infectaron con el baculovirus Bac-GFP/VP90 a una multiplicidad de infección de 1 y se cosecharon a las 24, 48, 72 y 96 horas después de la infección. El contenido proteico de las fracciones celulares se analizó por *immunoblot* utilizando al anticuerpo dirigido contra HAstV-8.

Con este análisis se observó que el tiempo de cosecha influye tanto en la cantidad de la proteína como en su integridad. A pesar de tener una banda de ~120 kDa más intensa a 96 hpi, a este mismo tiempo de cosecha se ven más enriquecidas las bandas de ~85, ~60 y ~48 kDa reflejando una mayor actividad proteolítica. Con base a este análisis se decidió utilizar un tiempo de cosecha de 72 hpi, con la finalidad de tener menor cantidad de productos de bajo peso que los obtenidos a 96 hpi.

3.- Purificación de la Proteína

Una vez determinadas las condiciones de infección y cosecha, se realizaron los ensayos para purificar las proteínas VP90 y GFP/VP90. Los cultivos se infectaron con una multiplicidad de infección de 1 durante 72 horas. El sobrenadante SN¹ y la fracción celular P¹ de los cultivos se separaron por centrifugación y al igual que en los ensayos anteriores la proteína recombinante GFP/VP90 se encontró únicamente asociada a la fracción celular, por lo que la purificación de ambas proteínas (VP90 y GFP/VP90) se hizo a partir de esta fracción. Esta fracción fue nuevamente procesada, y la proteína viral fue detectada tanto en el sobrenadante (SN²) como en la pastilla resultante (P²) como se observó en el ensayo de *western blot* utilizando el anticuerpo contra HAstV-8 (figura 14). En ambos casos, aunque la proteína viral se detectó en ambas fracciones, la proteína VP90 fue más abundante en la fracción de la pastilla P².

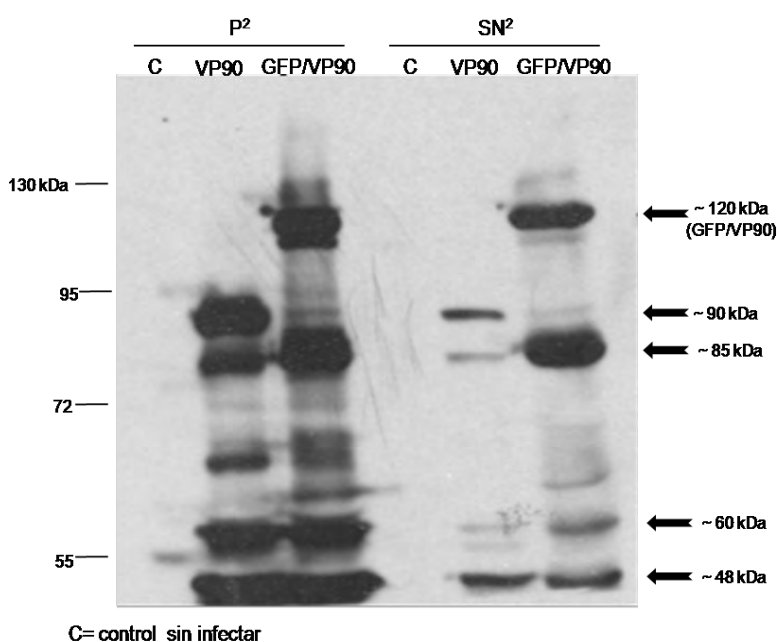


Figura 14.- Detección de las proteínas GFP7VP90 y VP90 en el sobrenadante y en pastilla celular. Células sf9 infectadas con el baculovirus Bac-VP90 y Bac-GFP/VP90 a una multiplicidad de infección de 1 durante. Las proteínas se detectaron utilizando el anticuerpo contra HAstV-8

En el caso de la infección por el baculovirus Bac-GFP/VP90, predominaron las cuatro bandas de ~120, ~85, ~60 y ~48 kDa. La intensidad de las bandas de ~120 y ~85 varía poco entre ambas fracciones (P² y SN²), mientras que la intensidad de las bandas de 60 y 48 kDa es menor en el sobrenadante SN² que en la fracción celular P² (figura 14). De la infección por el baculovirus Bac-VP90 se

obtuvieron principalmente cinco bandas de alrededor de 90, 85, 60 y 48 kDa en la fracción celular P², mientras que en el sobrenadante predominantemente se observaron las bandas de 90 y 48 kDa (figura 14). Con base al análisis proteico, se observó que las proteínas VP90 y GFP/VP90 se distribuían entre la fracción celular P² y el sobrenadante SN² después de la lisis celular. Con la finalidad de mejorar la cantidad y calidad de la proteína, se continuó con la purificación a partir de las dos fracciones. Dado que existía la posibilidad que las proteínas presentes en la fracción celular se encontraran en cuerpos de inclusión o asociadas a membranas celulares, como se describió anteriormente para la proteína de HAstV-1 Bonaparte (2008), se utilizó el protocolo de purificación reportado por Bonaparte y colaboradores Bonaparte (2008).

3.1.- Purificación de la Proteína Contenida en la Fracción Celular

Para purificar a la proteína contenida en la fracción P², se utilizó el protocolo descrito por Bonaparte y colaboradores Bonaparte (2008) (descrito en la sección de metodología), quienes reportaron que la mayor parte de la proteína estructural de HAstV-1 producida en células sf9 infectadas con baculovirus recombinantes forma agregados. En el caso de la proteína GFP/VP90, la fluorescencia se observa como puntilleo dentro de las células sf9 infectadas (figura 15A). Con la finalidad de observar a mayor detalle este patrón, estas células se analizaron por microscopia electrónica (figura 15B) encontrando regiones electro-densas que podrían corresponder a la proteína GFP/VP90 formando agregados al interior de estas. Con el análisis de microscopia electrónica también fue posible observar baculovirus al interior del núcleo (figura 15B).

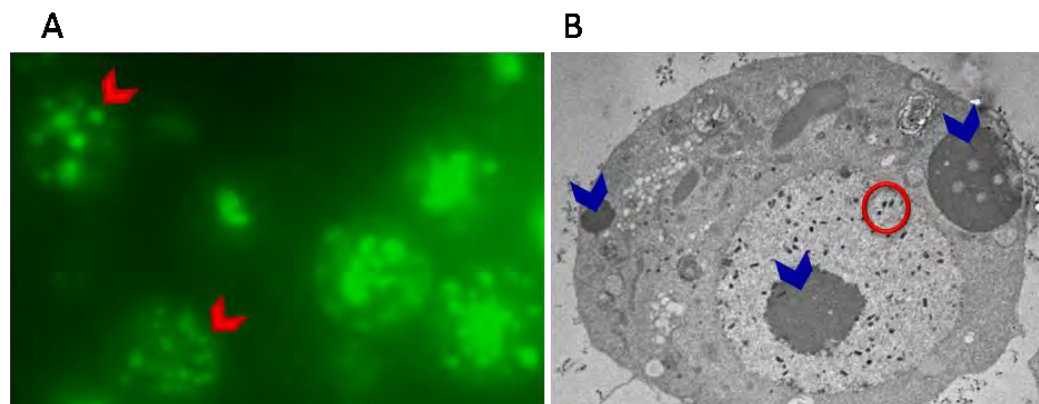


Figura 15.- Análisis de la expresión de la proteína GFP/VP90 en células sf9. A) La fluorescencia presenta un patrón de puntilleo dentro de las células (flechas en rojo) observado por microscopia de fluorescencia. B) Dentro de las células se observaron regiones electro-densas (flechas en azul) y baculovirus al interior del núcleo (círculo rojo) por microscopia electrónica.

De acuerdo a la metodología descrita, se analizó la presencia de la proteína viral en cada una de las fracciones del gradiente de sacarosa. En el caso del gradiente obtenido a partir de la infección con Bac-GFP/VP90, se observó una banda verde fluorescente hacia la parte baja del tubo lo que nos sugirió que la proteína de interés se encontraba en dicha fracción (Figura 16A). Con la finalidad de analizar la proteína en cada paso de la purificación, los sobrenadantes resultantes de la purificación (sobrenadantes del 2 al 5), una muestra de la pastilla (P) obtenida antes de la separación en el gradiente de sacarosa y las fracciones del gradiente se utilizaron para identificar la proteína viral por *western blot* (Figura 16 B).

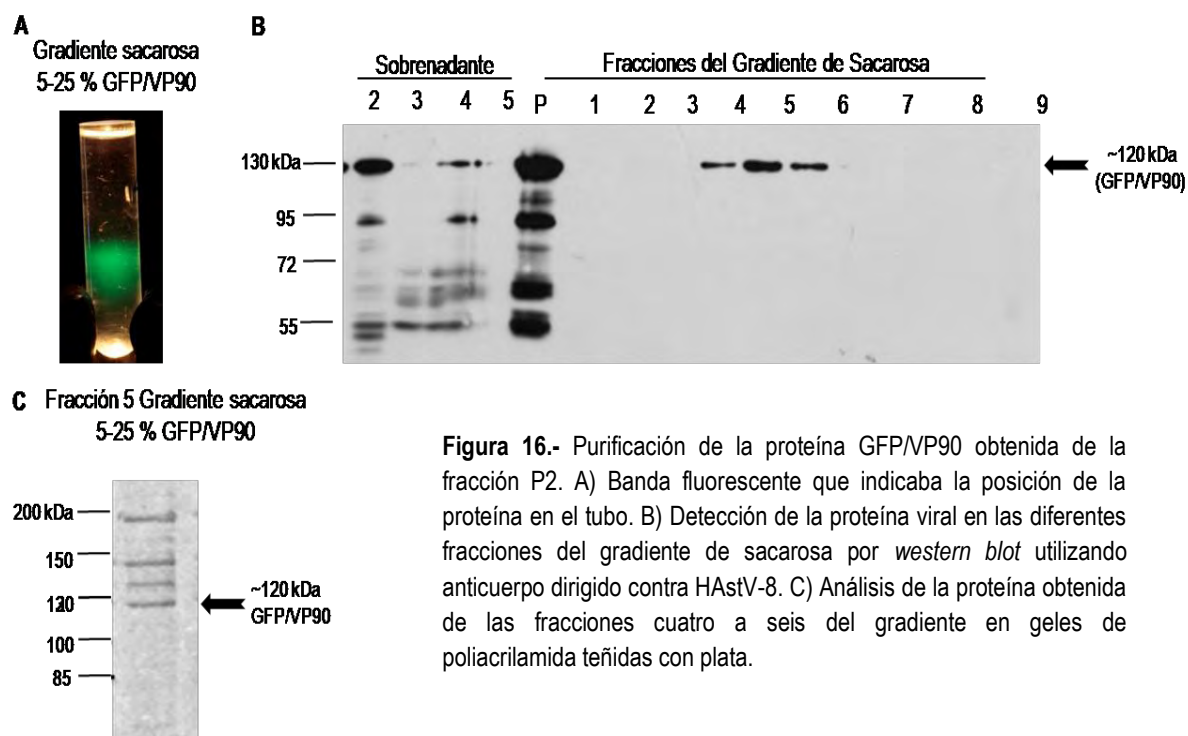


Figura 16.- Purificación de la proteína GFP/VP90 obtenida de la fracción P2. A) Banda fluorescente que indicaba la posición de la proteína en el tubo. B) Detección de la proteína viral en las diferentes fracciones del gradiente de sacarosa por *western blot* utilizando anticuerpo dirigido contra HAstV-8. C) Análisis de la proteína obtenida de las fracciones cuatro a seis del gradiente en geles de poliacrilamida teñidas con plata.

En los sobrenadantes resultantes solo se observó proteína viral en la fracción SN² y en SN⁴ (Figura 16 B). El SN² se utilizó posteriormente para purificar proteína, lo cual será descrito en la siguiente sección. Por otro lado, en la pastilla se detectaron las mismas cuatro bandas observadas anteriormente, mientras que en las fracciones 4, 5 y 6, que corresponden a la banda fluorescente observada en el gradientes antes del fraccionamiento, se detectó únicamente la banda de ~120 kDa, tamaño esperado para la proteína de fusión GFP/VP90 (Figura 16 B), lo cual se confirmó utilizando anticuerpos contra GFP y VP90 (ver sección 4). Para analizar la pureza de la proteína GFP/VP90, las fracciones 4, 5 y 6 se

mezclaron y se analizaron en geles de poliacrilamida teñidos con nitrato de plata (Figura 16 C). Además de la banda de ~120 kDa, se observaron cuatro bandas de mayor tamaño que podrían corresponder a proteínas celulares (Figura 16 C). Este análisis nos indicó que el protocolo utilizado para la purificación de la proteína GFP/VP90 nos permitió recuperar esta proteína, aunque contaminada con algunas proteínas celulares, por lo que también se utilizó para la purificación de la proteína VP90.

Para la proteína VP90 se siguieron los mismos pasos de purificación y también se analizaron los sobrenadantes, la pastilla y las fracciones de los gradientes de sacarosa (Figura 17). En este caso, se identificó casi exclusivamente una banda de ~90 kDa. La proteína VP90 se localizó entre las fracciones 5, 6 y 7. Una proteína de aproximadamente 72 kDa también se observó en la fracción 6 del gradiente en donde se observó la mayor expresión de VP90 (Figura 17).

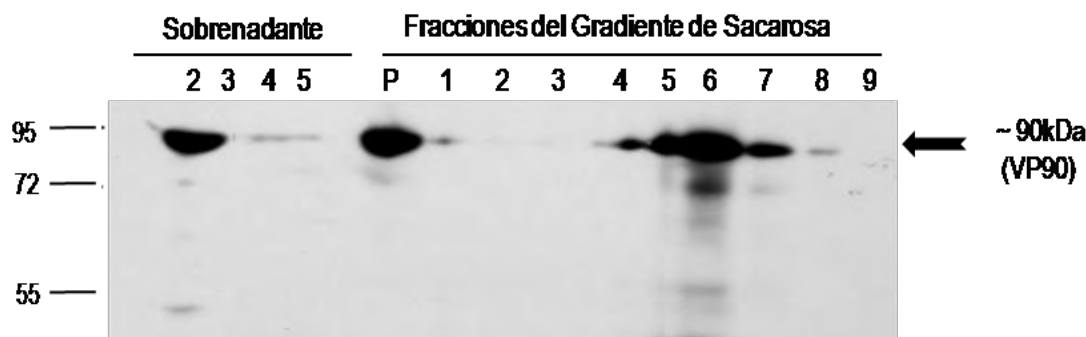


Figura 17.- Purificación de la proteína VP90 contenida en la fracción P². Se analizó el contenido de proteína viral en los diversos pasos de la purificación de la proteína así como las fracciones del gradiente de sacarosa. La proteína VP90 se encontró entre las fracciones 4 a 7 del gradiente, así como una proteína cercana a los 72 kDa. El análisis se hizo por western blot.

3.2.- Purificación de la Proteína Contenida en el Sobrenadante 2

Parte de la proteína GFP/VP90 producida se encuentra en el sobrenadante SN². A pesar de que había fluorescencia a lo largo de todo el tubo, se obtuvo una pastilla y una banda localizada justo entre la solución TNM (del SN²) y la solución de sacarosa (denominada banda de interfase, BI). Como nuestro interés era localizar la proteína GFP/VP90 se hizo un análisis del contenido proteico de las cuatro fracciones obtenidas, el sobrenadante (SN), la banda de interfase (BI), la solución de sacarosa (S) y la pastilla (P) (figura 18 A). Por medio del inmunoensayo, comprobamos que la proteína se encontraba

distribuida en las cuatro fracciones y, a pesar de que en la fracción S no se detectaron las bandas de 85 y 48kDa, solo la proteína GFP7VP90, se decidió continuar con la purificación a partir de la banda de interfase por gradientes de sacarosa y de la pastilla por gradientes de cloruro de cesio (CsCl) (figura 18 B), ya que era posible que la proteína contenida en esta interfase se encontrara de manera soluble, mientras que la proteína contenida en la pastilla podría estar formando VLPs. El gradiente continuo de sacarosa no se fracciono, solamente se obtuvo una banda fluorescente claramente visible la cual se analizó por *western blot*, detectandose predominantemente a la banda de ~120 kDa predominantemente (figura 18 C). Al analizarse esta misma fracción por tinción con azul de Coomassie se observaron varias bandas de menor peso molecular que probablemente sean de origen celular (figura 18 D). Del gradiente de CsCl no se recuperaron proteínas.

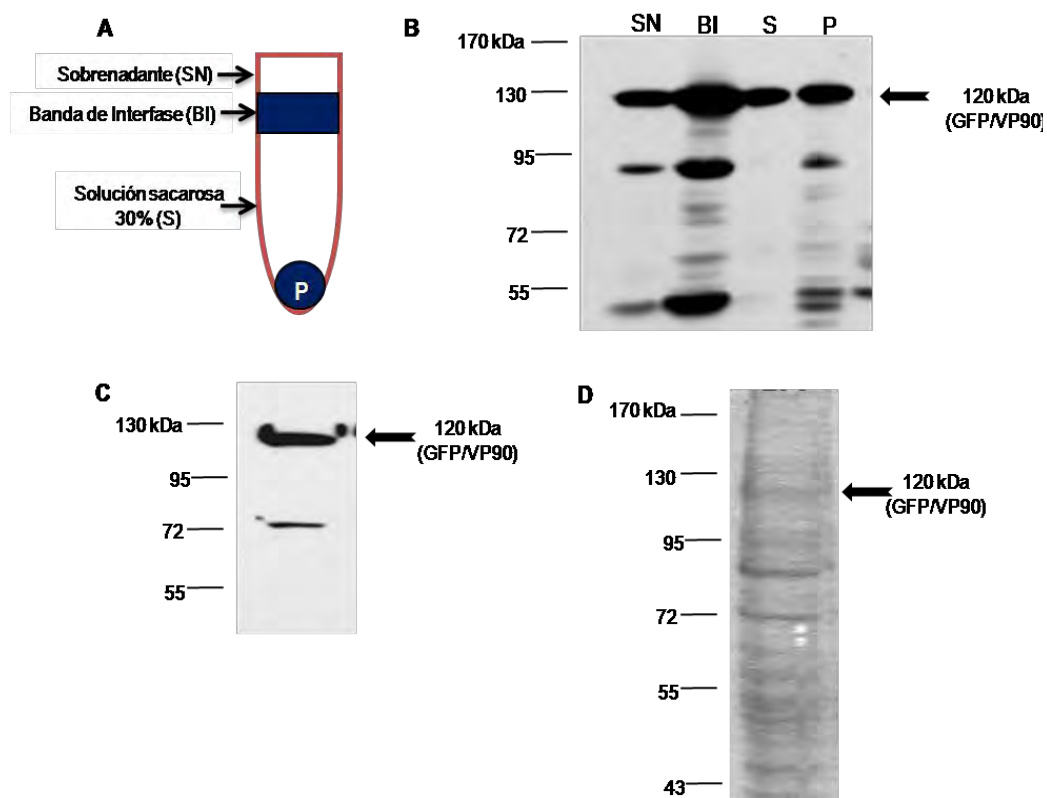


Figura 18.- Purificación de la proteína GFP/VP90 contenida en la fracción SN². A) Esquema de las fracciones observadas al pasar la proteína contenida en la fracción SN² a través de una solución de sacarosa al 30%. B) *Western blot* de dichas fracciones utilizando el anticuerpo contra HAstV-8. C) *Western blot* de la banda fluorescente obtenida durante la purificación a través de gradientes de sacarosa utilizando el anticuerpo contra HAstV-8. D) Análisis de pureza de la proteína obtenida de la banda fluorescente por tinción con azul de Coomassie.

Siguiendo el mismo procedimiento que para GFP/VP90, se purificó la proteína VP90 contenida en el sobrenadante SN². Al analizar la presencia de VP90 en las mismas fracciones utilizadas anteriormente (SN, BI, S y P), se detectaron cuatro bandas con diferente distribución (figura 19). En el sobrenadante SN, se identificó una banda mayoritaria menor a los 55 kDa, en la banda de interfase BI se detectaron cuatro bandas de ~90, ~85, ~60 kDa y una menor a los 55 kDa. En la solución de sacarosa no se detectó ninguna banda y en la pastilla se detectaron tres de ~90, ~85 kDa y en menor a los 55 kDa. Con este análisis observamos que la proteína VP90 se encontraba distribuida entre la banda de interfase y las pastilla. Al igual que la proteína GFP/VP90, la purificación de la proteína contenida en la banda de interfase se hizo por medio de un gradiente continuo de sacarosa, mientras que la proteína contenida en la pastilla, por medio de un gradiente de CsCl.

El gradiente de sacarosa se fraccionó y se analizó por *western blot*, encontrando la proteína VP90 se localizó entre las fracciones 4, 5, 6 y 7 (figura 19 C). Para determinar la pureza, la mezcla de estas fracciones se analizó en un gel de plocrilamida teñido con azul de Comassie. La banda correspondiente a VP90 se observa muy pobre. Se observan varias bandas adicionales que podrían corresponder a proteínas celulares.

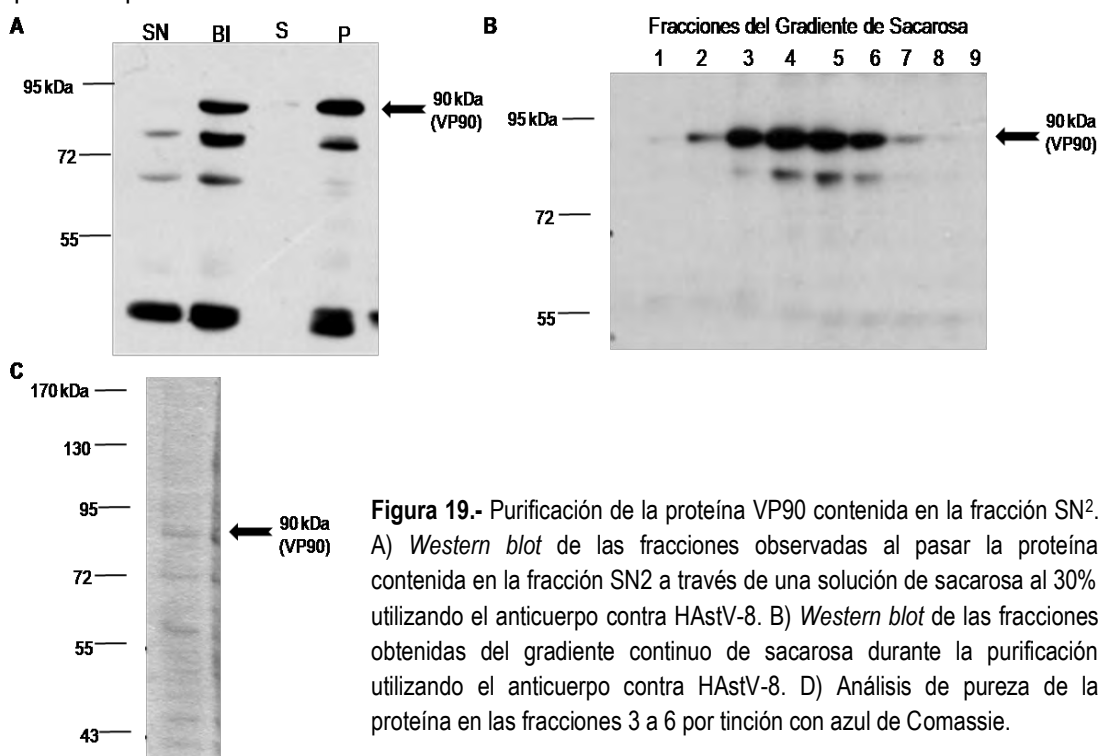


Figura 19.- Purificación de la proteína VP90 contenida en la fracción SN². A) *Western blot* de las fracciones observadas al pasar la proteína contenida en la fracción SN² a través de una solución de sacarosa al 30% utilizando el anticuerpo contra HAstV-8. B) *Western blot* de las fracciones obtenidas del gradiente continuo de sacarosa durante la purificación utilizando el anticuerpo contra HAstV-8. D) Análisis de pureza de la proteína en las fracciones 3 a 6 por tinción con azul de Comassie.

4.- Análisis de los Productos Derivados de la Proteólisis por Tripsina

Durante el ciclo replicativo de AstV las partículas virales formadas por VP70 son liberadas al medio extracelular y son procesadas por la tripsina contenida en el medio produciendo partículas virales infecciosas formadas por las proteínas VP25, VP27 y VP34. El procesamiento de la proteína VP70 produce varios intermediarios, y genera productos finales de proteólisis, algunos de los cuales se han identificado, al igual que los sitios de corte. Para analizar si las proteínas GFP/VP90 y VP90 obtenidas tanto del sobrenadante SN² como de la fracción celular generaban los mismos productos por tratamiento por tripsina como en el caso del virus, lo que podría sugerir una conformación similar, estas se incubaron durante 30 minutos en presencia de diferentes concentraciones de tripsina y se analizaron por *western blot*.

Para ello, la proteína GFP/VP90 presente en las fracciones 4 a 6 del gradiente de sacarosa (figura 16) se incubó durante 30 minutos con 0, 0.1, 1 y 10 $\mu\text{g/ml}$ de tripsina. Las muestras proteicas se analizaron por *western blot* con tres anticuerpos: el primero dirigido contra la proteína GFP, por lo que reconoce la región N-terminal de la proteína GFP/VP90 (figura 20); el segundo está dirigido contra el virus purificado HAstV-8, es decir contra partículas formadas por VP70, aunque también reconoce a VP90 (figura 20); y el tercero, anti-E4, está dirigido contra la región C-terminal de VP90 (residuos 666-782), por lo que no reconoce a VP70 ni a los productos que derivan de esta (figura 20).



Figura 20.- Esquema de la proteína GFP/VP90 y las regiones de la proteína que se utilizaron para generar los sueros utilizados en este trabajo.

El anticuerpo dirigido contra la proteína GFP, detectó la banda de 120 kDa observada en todos los análisis anteriores en ausencia de tripsina (figura 21). Al tratar con 0.1 $\mu\text{g/ml}$ de tripsina, la banda de 120 kDa dejó de observarse y apareció una banda de aproximadamente 27 kDa que corresponde, tanto por tamaño como por reactividad con el anticuerpo, a la proteína GFP libre de VP90. Esta misma banda se observó al utilizar las concentraciones de 1 y 10 $\mu\text{g/ml}$ de tripsina (figura 21). Utilizando el anticuerpo dirigido contra HAstV-8 y sin tratamiento con tripsina se observaron las bandas de 120 y 90 kDa, y otras

tres bandas con tamaños entre los 55 y 43 kDa (figura 21). La de 120 kDa identificada con el anticuerpo dirigido contra HAstV-8 corresponde a la banda del mismo tamaño observada con el anticuerpo dirigido contra GFP, lo que confirmó su identidad como GFP/VP90.

Con este análisis también comprobamos que la banda cercana a los 90 kDa corresponde a la proteína VP90 sin GFP. Al analizar la proteína tratada con 0.1 $\mu\text{g/ml}$ de tripsina (figura 21), se observó que las bandas correspondientes a las proteínas GFP/VP90 y VP90 desaparecieron y se enriquecieron dos bandas de menor tamaño, una de 43 kDa y otra de aproximadamente de 40 kDa, que parecen corresponder a productos de la proteína VP90, ya que no fueron observadas con el anticuerpo contra GFP (figura 21). Al aumentar la concentración de tripsina a 1 $\mu\text{g/ml}$ de tripsina, la banda de 45 kDa dejó de observarse quedando la banda cercana a 40 kDa y dos bandas menores de 26 kDa como productos de la digestión. Al utilizar 10 $\mu\text{g/ml}$ de tripsina solo se observaron las bandas menores de 26 kDa.

Por otro lado, utilizando el anticuerpo E4, se observaron las bandas correspondientes a la proteína GFP/VP90 y a la proteína VP90, al iniciar el tratamiento con tripsina estas bandas desaparecieron, dando lugar a las bandas cercanas a los 43 kDa, las cuales desaparecieron al tratar con mayores concentraciones de tripsina (figura 21).

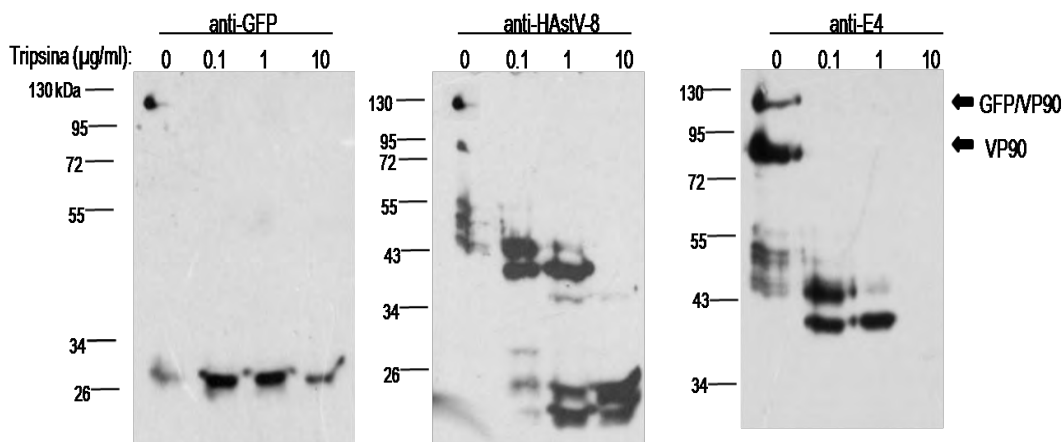


Figura 21.- Digestión por tripsina de la proteína GFP/VP90 obtenida de la fracción P². La proteína se incubó durante 30 minutos con diferentes concentraciones de tripsina, dichas muestras se corrieron en geles de poliacrilamida y se hicieron análisis de *western blot* utilizando los anticuerpos indicados.

El análisis hecho para la proteína GFP/VP90 obtenida de la fracción celular, se repitió con la proteína obtenida del sobrenadante. Aunque aparecieron productos intermedios diferentes en los dos casos, los productos finales presentaron tamaños similares, sugiriendo que la proteína derivada de ambas fracciones son similares (figura 22).

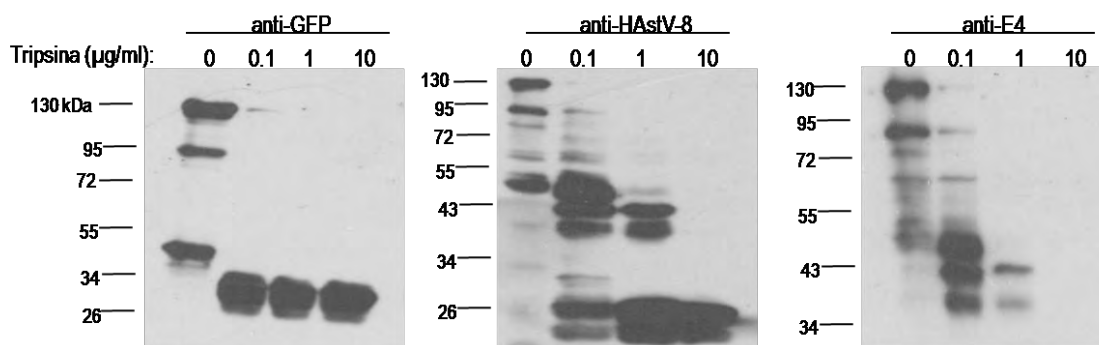


Figura 22.- Digestión por tripsina de la proteína GFP/VP90 obtenida de la fracción SN². La proteína se incubó durante 30 minutos con diferentes concentraciones de tripsina, dichas muestras se corrieron en geles de poliacrilamida y se hicieron análisis de *western blot* utilizando los anticuerpos indicados.

Para el análisis del procesamiento por tripsina de la proteína VP90 obtenida del sobrenadante SN², se utilizaron los anticuerpos dirigidos contra HAStV-8 y E-4 (figura 23). Con el primero, antes de tratar con tripsina se observaron una banda de 90 kDa y una cercana a los 45 kDa. La detección de dichas bandas se fue reduciendo a medida que la concentración de tripsina aumentaba, quedando dos bandas cercanas a los 26 kDa como productos finales, al igual que en el virión (figura 24).

Al analizar estas muestras con el anticuerpo dirigido contra el péptido E-4, se observaron las bandas de 90, 72 y 45 kDa de manera prominente y otras bandas de tamaños entre los 45 y 60 kDa, algunas de las cuales no se identificaron con el anticuerpo dirigido contra HAStV-8. Al tratar con tripsina, estas bandas ya no se detectaron, sin embargo se observaron dos bandas menores a los 43 kDa que no se detectan en la concentración máxima de tripsina. Este anticuerpo no detectó las proteínas de aproximadamente 26 kDa que se detectaron con el anticuerpo dirigido contra HAStV-8 a la mayor concentración de tripsina (figura 23).

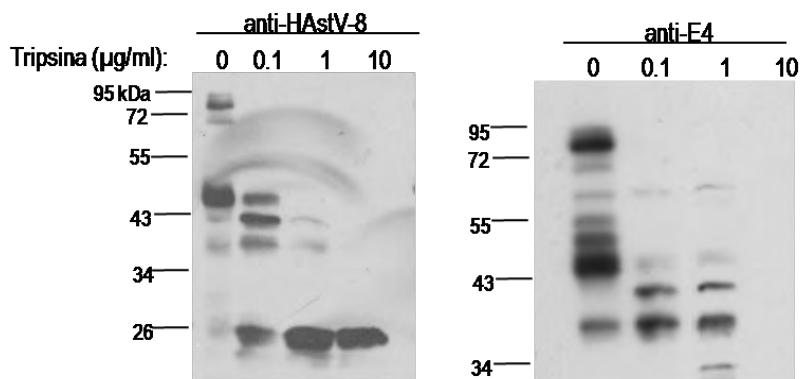


Figura 23.- Digestión por tripsina de la proteína VP90 obtenida de la fracción SN². La proteína se incubó durante 30 minutos con diferentes concentraciones de tripsina como se indica. Dichas muestras se corrieron en geles de poliacrilamida y se hicieron análisis de *western blot* utilizando tres anticuerpos. En el primer panel se observan los productos reconocidos por el anticuerpo dirigido contra HAStV-8, y en el segundo los productos reconocidos por el anticuerpo dirigido contra el péptido E4.

VII. Discusión

El objetivo del trabajo fue expresar la proteína de la cápside de una cepa de HAstV-8 VP90 y la proteína de fusión con la proteína verde fluorescente, con la finalidad eventual de utilizarla en estudios moleculares de ensamble y entrada del virus a su célula huésped. Para alcanzar este objetivo se utilizó el sistema de expresión Bac to Bac de Invitrogen que permite obtener baculovirus recombinantes que expresan proteínas de interés en células de insecto, en este trabajo se produjeron los baculovirus que expresan las proteínas VP90 y GFP/VP90. Para establecer las condiciones óptimas de infección que permitieran obtener la mayor cantidad de proteína posible, iniciamos el trabajo con la proteína GFP/VP90 ya que la fluorescencia de la propia proteína permite poder identificarla fácilmente. Dependiendo de la proteína que se esté expresando en este sistema heterólogo, esta puede ser secretada al medio extracelular o permanecer asociada a la fracción celular. Con la finalidad de determinar que ocurría durante la expresión de la proteína GFP/VP90 se analizó el contenido proteico de la fracción celular y del sobrenadante de un cultivo de células sf9 infectadas con el baculovirus recombinante. La proteína GFP/VP90 fue detectada en la fracción celular, lo que nos sugirió que la proteína podría encontrarse asociada a membranas o formando agregados como se reportó anteriormente para la proteína estructural de HAstV-1 Bonaparte (2008).

Entre los factores que pueden influir en la expresión de proteínas en el sistema Bac to Bac están la multiplicidad de infección y el tiempo de cosecha, por lo que probamos varias multiplicidades de infección y diferentes tiempos de cosecha para analizar el efecto sobre la expresión de VP90 y GFP/VP90. Observamos que la proteína GFP/VP90 se detecta con el anticuerpo anti-HAstV-8 a partir de las 48 horas después de la infección, conforme se aumenta el tiempo de cosecha y hasta las 96 horas después de la infección la aparición de bandas de menor peso molecular nos sugiere que la proteína sufre un procesamiento dentro de la célula y que este aumenta al transcurrir el tiempo en el que la proteína permanece en el interior celular. A partir de esta observación, decidimos cosechar los cultivos a las 72 horas con la finalidad de tener la mayor cantidad de proteína sin comprometer mucho su integridad. Por otro lado observamos pocas diferencias en cuanto a su expresión, en relación a la multiplicidad de infección, ya que entre la multiplicidad de infección de 0.1 y las de 1, 5 y 10 hay una pequeña diferencia en la concentración que no se observa con las multiplicidades altas, por lo que decidimos utilizar una multiplicidad de infección de 1.

Ya que la proteína GFP/VP90 fue detectada solo en la fracción celular, se hicieron tres ciclos de congelación/descongelación para liberar la proteína. A pesar de que gran cantidad de proteína se liberó al sobrenadante después de la lisis celular, la fracción celular seguía teniendo asociada proteína. Con la idea de poder recuperar la mayor cantidad de proteína se decidió continuar con la purificación a partir de ambas fracciones. Bonaparte y colaboradores (Bonaparte 2008), reportaron que la proteína de HAstV-1 se encontraba asociada como agregados y propusieron un protocolo de purificación que les permitió recuperar proteína de la fracción celular, por lo que decidimos utilizar este protocolo para la purificación de nuestras proteínas. La purificación nos permitió enriquecer la proteína de astrovirus completa, aunque también se detectaron algunas de menor tamaño, que pueden ser productos de proteólisis de la misma proteína, así como se detectaron proteínas celulares.

El procesamiento con tripsina se hizo con diferentes concentraciones de tripsina y se analizaron los productos con tres anticuerpos. El primer análisis se hizo con anti-GFP y se comprobó que la banda de ~120 kDa correspondía a la proteína completa GFP/VP90. Antes de tratar la proteína con tripsina se observó una banda cercana a los 27 kDa, al tratar la proteína con tripsina la banda de 120 kDa desapareció y se enriqueció la de 27 kDa. En la construcción de GFP/VP90, la GFP está reemplazando del aminoácido 7 al 36 de VP90, que se encuentran dentro de la región básica, comprendida entre los aminoácidos 18 al 62. A pesar de que esta región contiene muchos sitios potenciales de corte por tripsina (37 sitios en los primeros 340 residuos), estos no se procesan en el virus nativo, aun a altas concentraciones de la enzima, lo que indica que se encuentran protegidos hacia el centro de la partícula viral (Figura 24). El hecho de que no se hayan detectado productos discretos derivados de esta región sugiere que ésta se encuentra expuesta en la proteína GFP/VP90. Al hacer el análisis con el anticuerpo dirigido contra HAstV-8, además de observar la banda de 120 kDa se observó una cercana a los 90 kDa, esto nos confirmó lo observado con el anticuerpo anterior, que parte de la proteína GFP no se encontraba fusionada a la proteína VP90. Al tratar con tripsina la proteína se observaron bandas con tamaños cercanos a los productos reportados para el procesamiento del virus nativo, llegando a productos finales cercanos a los 26 y 25 kDa (Figura 24). Estas mismas muestras se analizaron con el anticuerpo dirigido contra el péptido E4, que incluye del aminoácido 666 al 782 de VP90, por lo que solo identifica a VP90 y a los productos que incluyan el extremo carboxilo terminal de la proteína. Con este anticuerpo no se identificaron varias de las bandas que sí se detectaron en el ensayo con la proteína no tratada con tripsina incluyendo la proteína de ~120 kDa, la proteína de ~90 kDa y varios productos

menores de 50 KDa. La presencia de estos productos sugirieron que la proteína es procesada intracelularmente en, al menos, dos sitios. Uno de ellos dentro de la región básica de VP90, lo que provoca la separación de la GFP, y otro, hacia la parte media. Al tratar la proteína con tripsina las bandas observadas con el anticuerpo dirigido contra E4 desaparecen, lo cual indica el procesamiento del carboxilo terminal en pequeños péptidos, que es consistente con lo que se observa al tratar el virus formado por VP90 con tripsina, en donde se observa que el anticuerpo anti-E4 reconoce esta región de VP90 que se procesa en fragmentos muy pequeños no identificables.

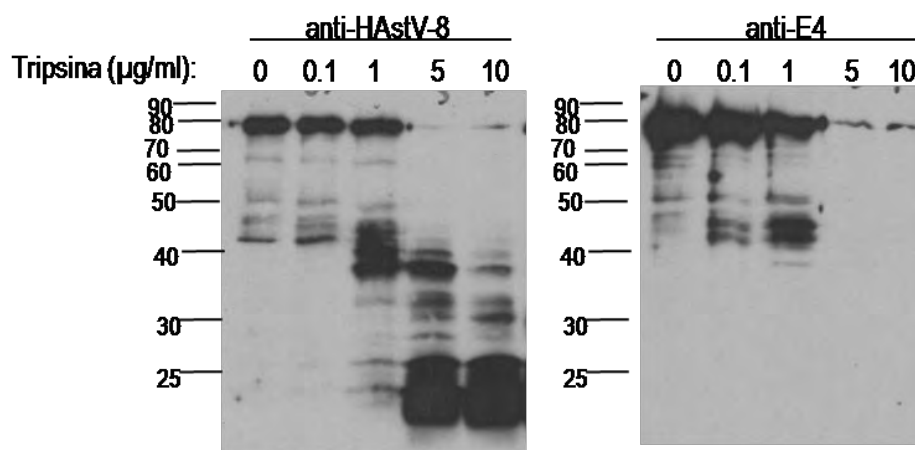


Figura 24.- Patrón de digestión por tripsina de astrovirus nativo. En el primer panel se observan los productos reconocidos por el anticuerpo dirigido contra HAstV-8, y en el segundo los productos reconocidos por el anticuerpo dirigido contra el péptido E4.

Con base a estas observaciones se ha propuesto que el procesamiento de la proteína GFP/VP90 con tripsina ocurre como se ilustra en la figura 25. Al parecer la proteína es cortada inicialmente liberando a la proteína GFP de la parte correspondiente a VP90, la cual se procesa posteriormente en la parte media dando como resultado dos productos de 43 y 47 kDa (figura 25). El producto de 43 kDa es procesado tanto en su amino terminal como en su carboxilo terminal para dar los productos finales de 26 y 25 KDa, que son de tamaño similar a los que se obtienen por el procesamiento del virion (figura 25), por lo que al menos esta región de las proteínas recombinantes tienen una conformación similar a la encontrada en los viriones (figura 25). Por otro lado el procesamiento del producto de 43 kDa no pudo ser determinado (Figura 22), sin embargo parece que el extremo carboxilo terminal se procesa en péptidos muy pequeños porque no se detectó un producto de 20 kDa que representaría la diferencia entre VP70 y VP90, tal y como ocurre con el virion (Figura 24).

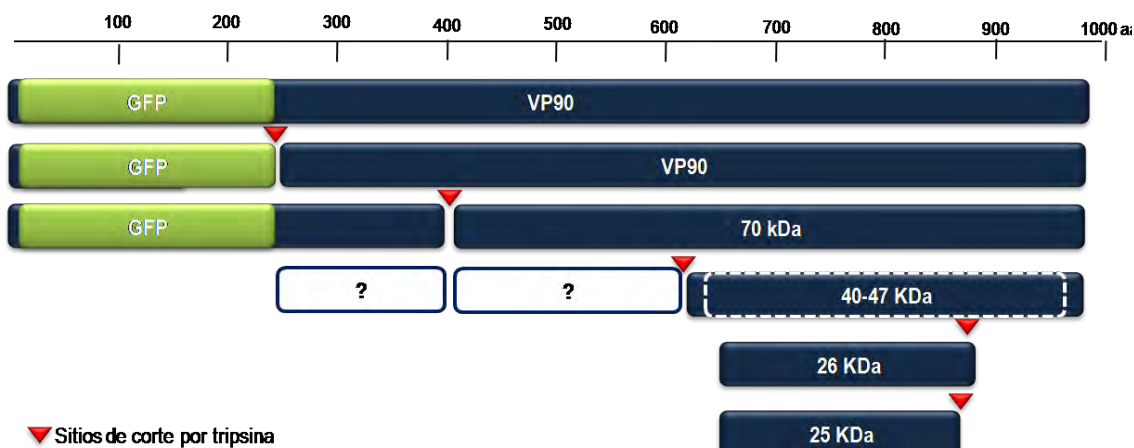


Figura 25.- Esquema del procesamiento de la proteína GFP/VP90.

Al igual que con la proteína anterior y con base en las observaciones hechas pensamos que el procesamiento de VP90 como se describe en la figura 26. Al parecer la proteína VP90 podría ser procesada en alguna región dentro de sus primeros 200 aminoácidos o alrededor del aminoácido 657 tal y como sucede en el virión (figura 26). En ambos casos se generan productos alrededor de los 70 kDa donde uno conserva el carboxilo terminal, ya que es reconocido por el anticuerpo dirigido contra E4, y el otro el amino terminal que es reconocido por el anticuerpo dirigido contra HAsT-8 (figura 26). Estos productos parecen ser procesados posteriormente para dar origen a productos de menores tamaños, de los cuales solo se detectó uno cercano a los 45 kDa (figura 26). Este último es procesado dando origen a los productos de 25 y 26 kDa que se observan con el virión. El otro producto no pudo ser detectado (figura 26).

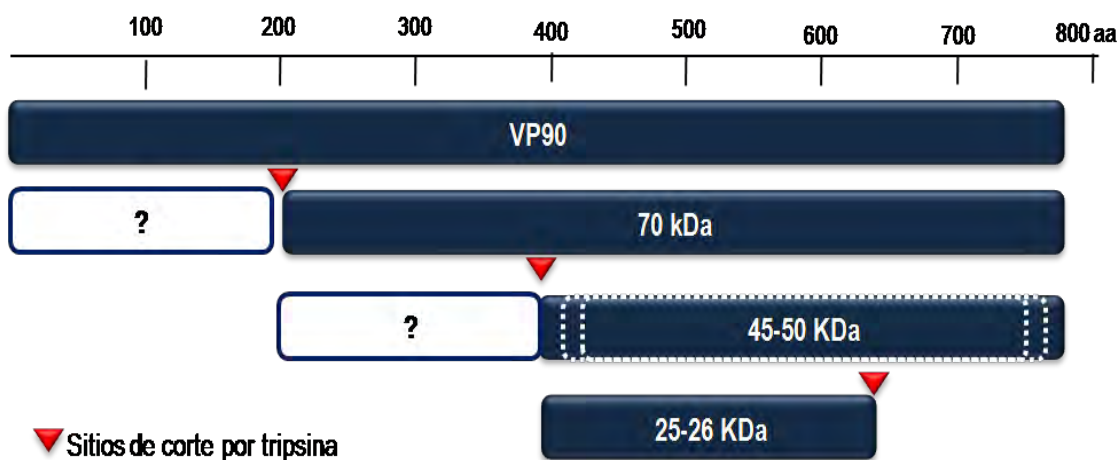


Figura 26.- Esquema del procesamiento de la proteína VP90.

El análisis con los anticuerpos nos indica que la proteína obtenida parece estar ensamblada de manera similar a como esta en el virión en su extremo carboxilo terminal, ya que se obtienen los mismos productos que se obtienen cuando se trata al virus con tripsina, a pesar de que existen 35 sitios potenciales para el corte con esta enzima. Por otro lado, el amino terminal no parece estar ensamblado como en el virus ya que no se detectaron los productos correspondientes a VP41-VP34, en donde existe un mayor número de sitios potenciales de corte para la enzima (37 sitios), específica en la zona básica, que se ha propuesto como sitio de unión a RNA, con 22 residuos de arginina.

El análisis del procesamiento por tripsina, nos sugiere que las proteínas recombinantes no se encuentran formando VLPs o que forman VLPs inestables, ya que presentan una susceptibilidad al corte por tripsina mayor al visto con el virus. Se ha visto en algunos virus icosaédricos de ssRNA(+), como FHV Schneemann (2003), donde la proteína estructural expresada en un sistema heterólogo, es capaz de formar VLPs que tienen propiedades biofísicas diferentes al virus nativo, como mayor susceptibilidad a la acción de proteasas debido a su menor estabilidad y se estabilizan en la presencia del RNA genómico Schneemann (2003), ya que HAstV es un virus icosaédrico con genoma de ssRNA(+), es posible que al igual que FHV, se requiera la presencia de RNA genómico para estabilizar las proteicas y poder formar VLPs. En otros casos, como el de Sindbis virus (SINV) Tellinghuisen (1999), las proteínas no son capaces de formar VLPs en ausencia de oligómeros de RNA o DNA, por lo que sería el caso de Astrovirus, para comprobar esto sería necesario analizar el ensamble de la proteína purificada en presencia de RNA viral u oligoneros de RNA de doble cadena.

La interacción entre el genoma y las proteínas de la cápside no solo podría ser importante para generar partículas estables, sino también para el ensamble de la proteína como VLPs. Con base a estos reportes podemos pensar que en el caso de HAstV podría requiere material genético para que la proteína pueda ensamblarse en VLPs estables. A pesar de que Caballero y colaboradores Caballero (2004), reportan la obtención de VLPs con la proteína de HAstV-1, estas no han sido obtenidas por otros grupos que también utilizan este mismo virus y sistema de expresión Moser (2007), Bonaparte (2008).

A pesar de que VP90 expresada en baculovirus no está formando VLPs, su purificación podría ser útil para estudiar su interacción con el genoma viral y eventualmente desarrollar un modelo para estudiar el proceso del ensamble del virus.

VIII. Conclusiones

- ▶ Se generaron los baculovirus recombinantes que expresan la proteína estructural de HAstV-8, VP90, nativa y fusionada con GFP.
- ▶ Tanto la multiplicidad de infección como el tiempo de cosecha afectan la producción de las VLPs
- ▶ Las proteínas VP90 y VP90/GFP son procesadas proteolíticamente dentro de la célula.
- ▶ El dominio carboxilo terminal de la proteína estructural de astrovirus producida por baculovirus parece ser similar al que se encuentra en el virión.

IX. Perspectivas

- ▶ Analizar el efecto de diferentes factores, tales como presencia de iones divalentes y moléculas de RNA, diferentes pH's, etc. sobre el ensamble de las proteínas GFP/VP90 y VP90 como VLP's.
- ▶ Analizar regiones de las proteínas que participan en el ensamble como VLP's por estudios de mutagénesis dirigida.
- ▶ Utilizar las VLP's en experimentos de entrada de HAstV.

X. Referencias

- Bass, DM et al (1997).** "Characterization of Human Serotype 1 Astrovirus Neutralizing Epitopes", *Journal of Virology*, 71:8666-8671.
- Bass, DM and Shiqiang Qiu (2000).** "Proteolytic Processing of the Astrovirus Capsid", *Journal of Virology*, 74(4):1810-14.
- Banos-Lara, R et al (2010).** "Role of individual caspases induced by astrovirus on the processing of its structural protein and its release from the cell through a non-lytic mechanism", *Virology*, in press.
- Bonaparte, RS et al (2008).** "Human Astrovirus Coat Protein Inhibits Serum Complement Activation via C1, the First Component of the Classical Pathway", *Journal of Virology*, 82(2):817-827.
- Caballero, S et al (2004).** "Structural Requirements of Astrovirus Virus-Like Particles Assembled in Insect Cells", *Journal of Virology*, 78(23):13285-13292.
- Carter, MJ and Willcocks, MM (1996).** "The Molecular Biology of Astroviruses", *Archives of Virology.-Supplementum*, 12:277-85.
- Desselberger, U and Gray, J (2003).** "Viral Gastroenteritis, Section I.- Viral gastroenteritis: Causes, pathophysiology, Immunology, treatment and epidemiology". Elsevier Science, 1-8.
- Dimitrov, D (2004).** "Virus Entry: Molecular Mechanism and Biomedical Applications", *Microbiology, Nature Reviews*, 2:109-122.
- Donelli, G et al (1992).** "Mechanism of Astrovirus Entry Into Graham 293 Cells", *Journal of Medical Virology*, 38: 271-277.
- Englund, L et al (2002).** "Astrovirus Epidemiologically Linked to Pre-Weaning Diarrhoea in Mink", *Veterinary Microbiology*, 85(1):1-11.
- Finkbeiner, SR et al (2008a).** "Metagenomic Analysis of Human Diarrhea: Viral Detection and Discovery", *PLOS Pathogens*, 4(2): e1000011.
- Finkbeiner, SR et al (2008b).** "Complete Genome Sequence of a Highly Divergent Astrovirus Isolated from a Child with Acute Diarrhea", *Virology Journal*, 5:117-123.
- Finkbeiner, SR et al (2009).** "Detection of Newly Described Astrovirus MLB1 in Stool Samples from Children", *Emerging Infectious Diseases*, 15 (3):441-444.
- Geigenmüller, U et al (2002a).** "Studies on Intracellular Processing of the Capsid Protein of Human Astrovirus Serotype 1 in Infected Cells", *Journal of General Virology*, 83:1691-1695.
- Geigenmüller, U et al (2002b).** "Processing of Non-Structural Protein 1a of Human Astrovirus", *Journal of General Virology*, 76(4):2003-08.
- Geigenmüller, U et al (2003).** "Viral Gastroenteritis, Section V.1.- Studies on the Molecular Biology of Human Astrovirus". Elsevier Science, 573-586.
- Helenius, A (2007).** "Fields Virology, Chapter 4: Virus Entry and Uncoating", Lippincott-Raven Publishers, 99-118.
- Hemert, F et al (2007).** "Different Rates of (non-)Synonymous Mutations in Astroviruses Genes; Correlation With Gene Function", *Virology Journal*, 4(25).
- Hoshino, Y et al (1981).** "Detection of Astroviruses in Feces of a Cat With Diarrhea", *Brief Report, Archives of Virology*, 70(4):373-376.

-
- Hunter, E (2006).** "Fields Virology, Chapter 6: Virus Assembly", Lippincott-Raven Publishers, 141-168.
- Imada, T et al (2000).** "Avian Nephritis Virus (ANV) as a New Member of the Family Astroviridae and Construction of Infectious ANV cDNA", *Journal of Virology*, 74(18): 8487-8493.
- Jiang, B et al (1993).** "RNA Sequence of Astrovirus: Distinctive Genomic Organization and a Putative Retrovirus-like Ribosomal Frameshifting Signal that Directs the Viral Replicase Synthesis", *PNAS*, 90(22):10539-10543.
- Johnson, MC et al (2002).** "Nucleic Acid-Independent Retrovirus Assembly Can be Drive by Dimerization", *Journal of Virology*, 76 (22): 11177-11185.
- Kiang, D and Matsui, SM (2002).** "Proteolytic Processing of a Human Astrovirus Nonstructural Protein", *Journal of General Virology*, 83:25-34.
- Kjeldsberg, E and Hem, A (1985).** "Detection of Astroviruses in Gut Contents of Nude and Normal Mice", *Brief Report, Archives of Virology*, 84(1):135-140.
- Koci, MD and Schultz-Cherry, S (2002).** "Review: Avian Astrovirus", *Avian Pathology*, Houghton Trust Ltd. 31: 213-227.
- Koci, MD et al (2003).** "Astrovirus Induces Diarrhea in the Absence of Inflammation", *Journal of Virology*, 77(21):11798-11808.
- Koci, MD (2005).** "Review: Immunity and Resistance to Astrovirus Infection", *Viral Immunity*, Mary Ann Liebert Inc. 18(1): 11-16.
- Krishna, NK (2005).** "Identification of Structural Domains Involved in Astrovirus Capsid Biology", *Viral Immunology*, 18(1):17-26.
- Lewis, TL et al (1994).** "Analysis of Astrovirus Serotype 1 RNA, Identification of the Viral RNA Dependent RNA Polymerase Motif, and Expression of a Viral Structural Protein", *Journal of Virology*, 68:77-83.
- Lewis, TL and Matsui, SM (1995).** "An Astrovirus Frameshift Signal Induces Ribosomal Frameshifting *in vitro*", *Archives of Virology*, 140:1127-1135.
- Liu, S et al (2001).** "Endocytosis, Chap 1: Clathrin-Mediated Endocytosis", Oxford University Press, 1-25.
- Marsh, M and Helenius, A (2006).** "Virus Entry: Open Sesame", Cell Elsevier Inc, 124:729-740.
- Marshall, JA et al (1984).** "Viruses and Virus-Like Particles in the Faeces of Dogs With and Without Diarrhoea", *Australian Veterinary Journal*, 61(2):33-38.
- Matsui, SM and Greenberg, HB (1996).** "Fields Virology, Chapter 26: Astroviruses". Lippincott-Raven Publishers. 811-823
- Matsui, SM et al (2001).** "Gastroenteritis Viruses: Molecular Biology of Astroviruses: Selected Highlights". Novartis Foundation, Wiley, 219-236.
- Méndez, E et al (2002).** "Proteolytic Processing of a Serotype 8 Human Astrovirus ORF2 Polyprotein", *Journal of Virology*, 78(16): 7996-8002.
- Méndez, E et al (2003).** "Protein Products of the Open Reading Frames Encoding Nonstructural Proteins of Human Astrovirus Serotype 8", *Journal of Virology*, 77(21):11378-11384.
- Méndez, E et al (2004).** "Caspases Mediate Processing of The Capsid Precursor and Cell Release of Human Astroviruses", *Journal of Virology*, 76(16): 8601-8608.
- Méndez, E and Arias, C (2007).** "Fields Virology, Chapter 29: Astroviruses", Lippincott-Raven Publishers
-

-
- Méndez-Toss, M et al (2000).** "Molecular Analysis of a Serotype 8 Human Astrovirus Genome", *Journal of General Virology*, 81:291-2897.
- Monroe, SS et al (2001).** "Gastroenteritis Viruses: Molecular Epidemiology of Human Astroviruses". Novartis Foundation, Wiley, 237-249.
- Moser, LA and Schultz-Cherry, S (2005).** "Review: Pathogenesis of Astrovirus Infection". *Viral Immunology*, 18 (1):4-10.
- Moser, LA et al (2007).** "Astrovirus Increases Epithelial Barrier Permeability Independently of Viral Replication". *Journal of Virology*, 81 (21):11937-11945.
- Parashar, UD and Glass, RI (2003).** "Viral Gastroenteritis, Section I.1.- Viral gastroenteritis: Causes, pathophysiology, Immunology, treatment and epidemiology". Elsevier Science, 1-8.
- Pelkmans, L et al (2002).** "Local Actin Polymerization and Dynamin Recruitment in SV40 Induced Internalization of Caveolae", *Science*, 296:535-539.
- Sánchez-Fauquier, et al (1994).** "Characterization of a Human Astrovirus Serotype 2 Structural Protein (VP26) that Contains an Epitope Involved in Virus Neutralization", *Virology*, 201:312-320.
- Shimizu, M et al (1990).** " Cytopathic Astrovirus Isolated from Porcine Acute Gastroenteritis in an Established Cell Line Derived from Porcine Embryonic Kidney", *Journal of Clinical Microbiology*, 28(2):201-206.
- Shneemann, A (2003).** "Viral Assembly Using Heterologous Expression Systems and Cell Extracts". *Advances in Protein Chemistry*, Elsevier Science, 64:1-36
- Shneemann, A (2006).** "The Structural and Functional Role of RNA in Icosahedral Virus Assembly". *The Annual Review of Microbiology*, 60: 51-67
- Snodgrass, DR and Gray, EW (1977).** "Detection and Transmission of 30nm Virus Particles (Astroviruses) in Faeces of Lambs With Diarrhoea ", *Archives of Virology*, 55(4):287-291.
- Tellinghuisen, TL et al (1999).** "In Vitro Assembly of Alphavirus Core by Using Nucleocapsid Protein Expressed in *Escherichia coli*". *Journal of Virology* 73 (7): 5309-5319.
- Thouvenelle, ML et al (1995).** "Astrovirus Infection in Hatching Turkeys: Alterations in Intestinal Maltase Activity". *Avian Disease*, 39:343-348.
- Wang, Q et al (2001).** "Genetic Analysis of the Capsid Region of Astroviruses", *Journal of Medical Virology*, 64:245-255.
- Woode, GN et al (1984).** "Astrovirus and Breda Virus Infections of Dome Cell Epithelium of Bovine Ileum", *Journal of Clinical Microbiology*, 19(5):623-630.
- Zhu, HC et al (2009).** "Detection of Diverse Astroviruses of Bats in China", *Journal of General Virology*, 90:883-887.
- Zlotnick, A (2003).** "Are Weak Protein-Protein Interactions the General Rule in Capsid Assembly", *Virology*, 315: 269-274.