



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CUATRO
MUTANTES DEL FACTOR DE VIRULENCIA NS1 DEL
VIRUS DE INFLUENZA A.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

DIANA MARISA SÁNCHEZ GALINDO



MÉXICO, D.F.

2015



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor:** Jesús Fernando Montiel Aguirre

VOCAL: **Profesor:** Rocío Gabriela Tirado Mendoza

SECRETARIO: **Dra. :** María Teresa Santos Mendoza

1er. SUPLENTE: **Profesor:** Julio César Martínez Álvarez

2º SUPLENTE: **Profesor:** Verónica Garrocho Villegas

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS
"ISMAEL COSÍO VILLEGAS"

ASESOR DEL TEMA:

Dra. María Teresa Santos Mendoza

SUSTENTANTE:

Diana Marisa Sánchez Galindo

Dedicatoria

A mis padres por la semilla de superación que han sembrado en mí.
Cuesta mucho saber lo que es el amor, siempre han estado para mí,
empujándome y guiándome, siempre para seguir adelante.
Doy gracias por todo lo que han hecho y mantengo la esperanza de
poder regresarles algo de lo mucho que me han dado.
Me han enseñado como amar, como querer, me enseñaron que
siempre estarán ahí.
El mayor orgullo, tener el honor de decir que son mis padres.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la capacidad de desarrollar capacidades y competencias que me ayudaron a formarme como profesionalista.

A mi hermana Karen por su comprensión y apoyo incondicional a lo largo de mis estudios.

A mi asesora, la Dra. María Teresa Santos Mendoza por haber confiado en mi persona y por haberme brindado su valiosa y desinteresada orientación y guía en la elaboración del presente trabajo.

Índice

Páginas

Índice	i
Abreviaturas y acrónimos	iv
Resumen	viii
1. Introducción	
1.1 Generalidades	1
1.2 NS1: Estructura y función	3
1.3 Los motivos PDZbm: Estructura y función	4
1.4 Los PDZbm de proteínas virales usurpan interacciones PDZ-dependientes del hospedero	6
1.5 Mutagénesis dirigida como herramienta para generar NS1 con diferentes PDZbm	9
2. Hipótesis	12
3. Objetivos	
3.1 Objetivo general	13
3.2 Objetivos particulares	13

4.	Metodología	
4.1	Plásmido y oligonucleótidos utilizados en la mutagénesis dirigida	14
4.2	Reacciones de mutagénesis dirigida	16
4.2.1	Progreso de la reacción	16
4.2.2	Transformación de células competentes	18
4.2.3	Purificación de plásmido	18
4.3	Comprobación de la mutagénesis dirigida mediante secuenciación	20
4.4	Comprobación de la expresión de los mutantes	20
4.4.1	Cultivo de células HeLa	20
4.4.2	Transfección de células HeLa	21
4.4.3	Extracción y cuantificación de proteína	21
4.3.4	Electroforesis, electrotransferencia e inmunodetección (Western Blot- WB)	22
4.4.4	Caracterización de los mutantes por IP	23
5.	Resultados y discusión	
5.1	Generación de los mutantes y obtención del plásmido	24

5.2	Caracterización de los mutantes	28
5.2.1	Secuenciación	28
5.2.2	Expresión de las proteínas NS1 mutantes	32
5.2.3	Inmunoprecipitación	34
6.	Conclusiones	38
7.	Bibliografía	39
	Apéndice: Composición de amortiguadores	43

Abreviaturas y acrónimos

A/aquatic bird/Korea/CN5/2009	Virus de referencia H6N5 de influenza de aves acuáticas A aislado en Korea en el 2009
A/felin/Korea/01/2010	Virus de referencia H3N2 de influenza de felinos A aislado en Korea en 2010
A/PR/8/34	Virus de referencia H1N1 de influenza humana A aislado en Puerto Rico en 1934
AAAA	Cuatro alaninas. Secuencia que no corresponde a un PDZbm
Ad	Adenovirus
APC	Supresor de tumores Adenomatous Polyposis Coli
β -gal	β -galactosidasa
BSA	Albúmina sérica bovina
CaCl ₂	Cloruro de Calcio
ddNTP	Didesoxinucleósido trifosfato
DLG1	Disc Large 1
DMEM	Del inglés, Dulbecco's modification of Eagle's medium
DNA	Del inglés, Deoxyribonucleic Acid
dNTP	Desoxinucleósidos trifosato
dsDNA	DNA de doble cadena
ESEV	Ácido glutámico, serina, ácido glutámico, valina. Secuencia consenso PDZbm de virus aviares H5N1
GuK	Guanilato cinasa
HA	Hemaglutinina
HPV	Virus de Papiloma Humano

HRP	Del inglés : Horseradish peroxidase
HTLV	Virus linfotrópicos de células T humanas
IAV	Virus de influenza A
IFN-I	Interferones tipo I
IP	Inmunoprecipitación
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
L27	Dominio de unión Lin2 y Lin7
LIM	Del inglés: Lin11, Isl-1 y Mec-3
LRR	Repeticiones ricas en leucina
M1	Proteína de matriz 1
M2	Proteína de matriz 2
MAGI-1	Guanilato cinasa asociada a la membrana con arreglo invertido
MAGUKs	Guanilato cinasas asociadas a membrana
NA	Neuraminidasa
nm	Nanómetro
NS2/NEP	Proteína de exporte nuclear
NP	Proteína de la nucleocápside
NS1	Proteína no estructural 1
NS1FL	Plásmido templado pCMVMyc_NS1FL
ON	Toda la noche
ORF	Marco abierto de lectura
PA	Polimerasa ácida del virus de influenza A
PBS	Solución salina amortiguadora de fosfatos
PB1	Polimerasa básica 1 del virus de influenza A

PB1-F2	Fragmento 2 de la polimerasa básica 1 del virus de influenza A
PB2	Polimerasa básica 2 de virus de influenza A
PDLim2	Del inglés PDZ and LIM domain protein 2
PDZ	Acrónimo Postsynaptic density PSD-95, Disc-large DLG and Zonula Occludens ZO-1
PDZbm	Motivo de unión a dominios PDZ
PI3K	Enzima PI3 cinasa
PRR	Receptor de Reconocimiento de Patrones
RIG-I	Gen inducible por ácido retinóico
RNA	Del inglés: Ribonucleic acid
RNP	Complejo viral ribonucleoprotéico
SFB	Suero fetal bovino
rpm	Revoluciones por minuto
RSEV	Arginina, serina, ácido glutámico, valina. Secuencia consenso PDZbm de virus humanos H1N1
RSKV	Arginina, serina, lisina, valina. Secuencia consenso de virus humanos H3N2
ssDNA	DNA de cadena sencilla
SH3	Dominio de homología con Src3
STOP	Codón de paro
TBS	Solución salina am ortiguadora Tris
TBS-T	Solución salina amortiguadora Tris con Tween 20
TJ	Del inglés: Tight junction
Tm	Temperatura de fusión
UV	Luz ultravioleta

WB Western Blot

X-gal 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

Resumen

El virus de la influenza A (IAV) es un patógeno de gran importancia clínica en humanos. En el segmento 8 del genoma de IAV están codificadas la proteína no estructural 1 (NS1) y la proteína de exporte nuclear (NS2/NEP) del virus. NS1 tiene la capacidad de unir RNA y proteínas afectando las funciones celulares del hospedero de muy diversas maneras y, es un factor de virulencia que, entre sus múltiples funciones, inhibe la respuesta de interferones tipo I (IFN-I) en el hospedero. NS1 cuenta con un motivo de unión a dominios PDZ (PDZbm) el cual está constituido por los últimos cuatro aminoácidos en su extremo carboxilo-terminal. La secuencia PDZbm puede variar de cepa a cepa, pero la mayoría de los virus aviares tienen la secuencia consenso ESEV, mientras que la mayoría de los virus humanos tienen las secuencias consenso RSKV/RSEV; los diferentes PDZbm confieren diferente grado de virulencia.

En este trabajo mediante mutagénesis dirigida se generaron plásmidos que codifican proteínas NS1 modificadas exclusivamente en el PDZbm **y fusionadas a una etiqueta "myc". Esto nos permitió expresar las** proteínas con las secuencias consenso de los virus humanos y de los virus aviares, así como una secuencia que no corresponde a un PDZbm (AAAA) y la eliminación del PDZbm por la inserción de un codón de paro temprano (STOP). Estos mutantes se caracterizaron mediante reacciones de secuenciación, por su expresión en la línea celular HeLa y por inmunoprecipitación (IP) de la proteína Scribble y servirán para describir interacciones PDZ-dependientes de NS1 con proteínas con dominios PDZ expresadas en células humanas.

1. Introducción

1.1 Generalidades

El virus de influenza es un agente infeccioso altamente contagioso causante de una de las enfermedades respiratorias más severas en humanos y es transmitido por el aire. El virus de influenza A (IAV) es un patógeno de gran importancia clínica en humanos por su capacidad de provocar epidemias y pandemias (Wright, 2007).

IAV fue aislado por primera vez de humanos en 1933 (Smith, 1993); es un virus de RNA de cadena sencilla y polaridad negativa, con 8 segmentos que codifican al menos 10 proteínas (Figura 1a) : las polimerasas (PB1, PB2 y PA), la hemaglutinina (HA), la proteína de la nucleocápside (NP), la neuraminidasa (NA), todas ellas expresadas a partir de sus respectivos segmentos, así como las proteínas de matriz (M1 y M2) codificadas por el segmento M, la proteína de exporte nuclear (NEP/NS2) y la proteína no estructural 1 (NS1) codificadas en el segmento NS (Medina, 2011).

La proteína no estructural N40 descrita en el virus de referencia H3N2 de influenza de felinos A aislado en Korea en 2010 (A/felin/Korea/01/2010) y en el virus de referencia H6N5 de influenza de aves acuáticas A aislado en Korea en el 2009 (A/aquatic bird/Korea/CN5/2009) (Wise, 2009), está codificada en el segmento PB1 y tiene un sitio de inicio río abajo de la polimerasa que produce una versión trunca de la proteína en el extremo N-terminal y cuya función es desconocida (Figura 1b) (Medina, 2011).

Una tercera proteína no estructural llamada PB1-F2 que es expresada solo por 81% de los virus humanos, 75% de los virus porcinos y 96% de los virus aviares de IAV, inhibe la producción de interferones tipo I

(IFN-I) y está codificada por un segundo marco abierto de lectura (ORF) en el segmento PB1 (Figura 1b) (Zell, 2007).

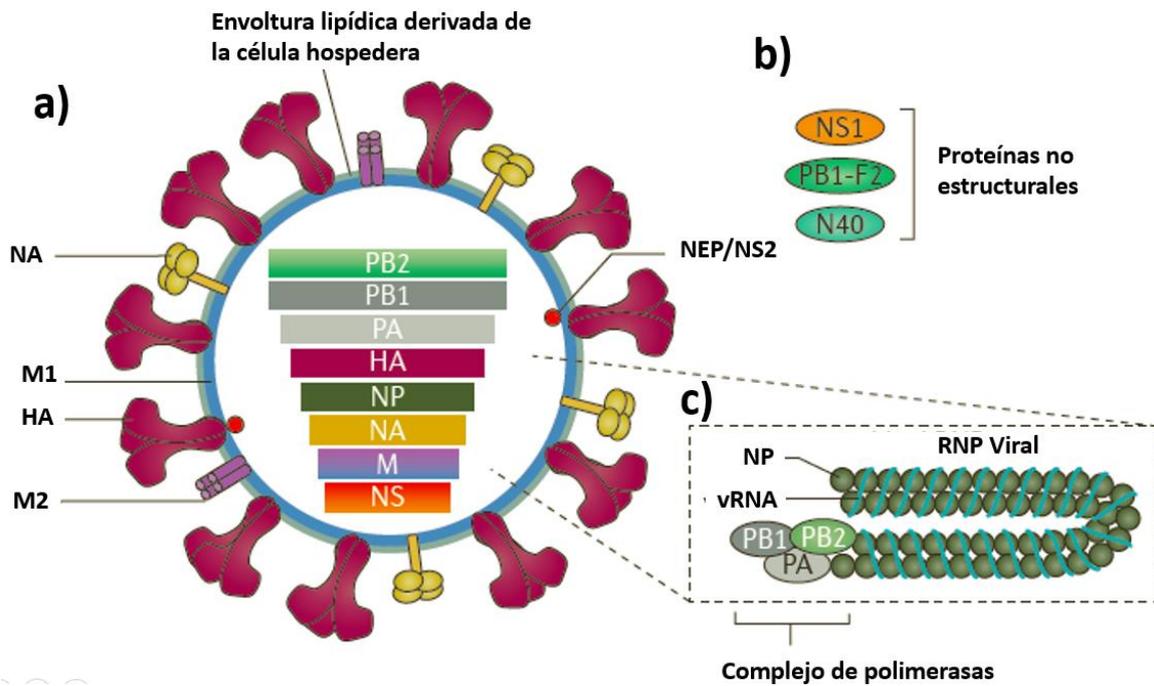


Figura 1. Representación esquemática del genoma de IAV. a) Se muestran los 8 segmentos de RNA del genoma de IAV ordenados de acuerdo a su tamaño, así como las proteínas de superficie NA y HA y las proteínas de matriz. En b) se representan las 3 proteínas no estructurales del virus de IAV. En c) se esquematiza la RNP formada por cada uno de los segmentos de RNA alrededor de NP unido al complejo de polimerasas (Modificado de Medina, 2011).

En el virión, cada uno de los 8 segmentos virales forma un complejo viral ribonucleoproteico (RNP): el RNA viral se envuelve alrededor de NP, y esta estructura se une al complejo de la polimerasa viral (Figura 1c) (Medina, 2011).

IAV se clasifica en subtipos de acuerdo a las glicoproteínas de superficie, hemaglutinina (H1- H18) y neuraminidasa (N1- N11) (Medina, 2011).

El genoma segmentado de IAV le confiere una alta capacidad de rearrreglo por intercambio de segmentos de genomas entre dos virus diferentes que infectan la misma célula, y puede contribuir al rápido desarrollo de nuevas cepas del virus en la naturaleza (Wright, 2007).

1.2 NS1: Estructura y función

En el segmento 8 del genoma de IAV están codificadas las proteínas NS1 y NS2/NEP del virus. NS1 puede cambiar de tamaño entre cepas pero la forma de 230 aminoácidos (aa) es la más común. Funcionalmente se divide en dos dominios; el dominio amino-terminal de unión a RNA que comprende los aa 1-73, y el dominio efector correspondiente a los aa 74 en adelante que media interacciones con proteínas del hospedero (Figura 2) (Hale, 2008).

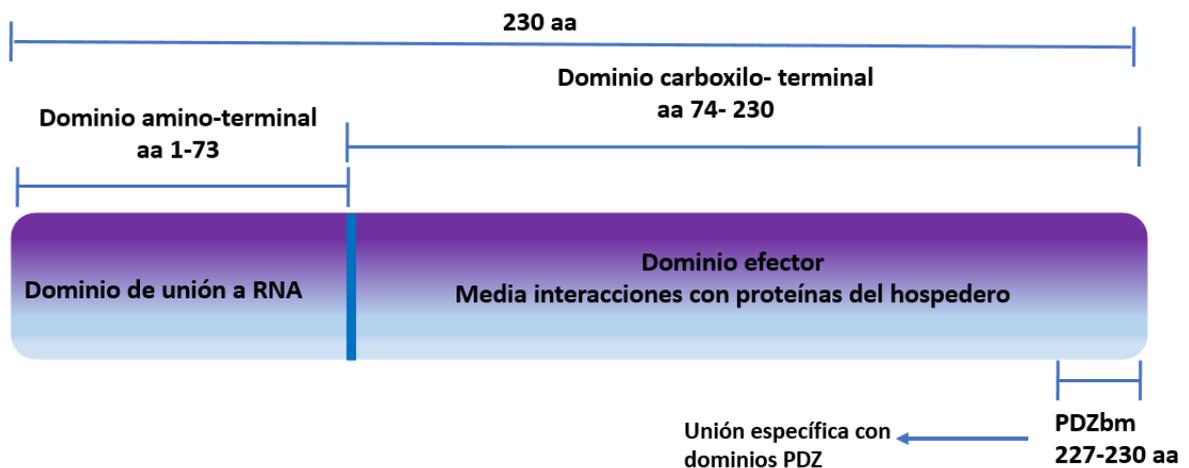


Figura 2. Representación esquemática de la estructura de la proteína NS1 de IAV con sus dos dominios funcionales. Los últimos cuatro aa (227-230) de la proteína corresponden al motivo PDZbm. (Modificado de Hale, 2008).

La capacidad de NS1 de unir RNA y proteínas le permite afectar las funciones celulares del hospedero de muy diversas maneras (Salomon, 2009). El dominio efector de NS1 tiene la capacidad de unirse a diferentes proteínas mediante secuencias específicas (dominios)

modificando así su función; por ejemplo, su interacción con la subunidad reguladora p85 de la enzima PI3 cinasa (PI3K), induce la activación de ésta y con ello la activación de vías antiapoptóticas en las células infectadas, lo que resulta en una eficiente replicación viral (Ehrhard, 2009).

Tras la exposición inicial a IAV, se activa el sistema inmune innato del hospedero mediante la identificación del virus por Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRR) entre estos, RIG-I (gen inducible por ácido retinoico). El reconocimiento del RNA viral en el citoplasma, mediado por RIG-I, induce la producción de interferones (INF) tipo I (α/β) y citocinas proinflamatorias vía una cascada en la que participa la proteína adaptadora MAVS, el factor de transcripción IRF3 y NF- κ B (Daviña- Núñez, 2012).

Los IFN-I son citocinas con efectos autócrinos y parácrinos que regulan la expresión de más de cien genes implicados en la actividad antiviral, induciendo la síntesis de proteínas antivirales en células adyacentes, las cuales se protegen del ataque del virus (Carswell, 1975). NS1 de IAV es un potente inhibidor de la activación de RIG-I, por lo que inhibe la inducción de IFN-I y en consecuencia se le considera un importante factor de virulencia ya que permite el establecimiento de la infección. (Daviña- Núñez, 2012).

1.3 Los motivos PDZbm: Estructura y función

NS1 contiene un motivo de unión a dominios PDZ (PDZbm) (Figura 2). Los motivos PDZbm corresponden con secuencias específicas en los últimos cuatro aminoácidos en el extremo carboxilo terminal de las proteínas que los poseen. Los motivos PDZbm han sido clasificados en al menos tres diferentes clases: los clase I que corresponden con la

secuencia consenso X-S/T-X-V/L/I; los clase II siguen el patrón X-Φ-X-Φ; y los de clase III tienen la secuencia consenso X-D/X-V, donde X representa cualquier aa y Φ representa un aa hidrofóbico. Las diferentes secuencias del PDZbm confieren diferentes especificidades de unión (Sheng, 2001).

El PDZbm se une de forma específica con una estructura de 80 a 90 aa conocida como el dominio PDZ (acrónimo del inglés, Postsynaptic density PSD-95, Disc-large DLG and Zonula Occludens ZO-1) (Sheng, 2001). Los dominios PDZ se han encontrado en proteínas de bacterias, plantas, levaduras, insectos y mamíferos (Ponting, 1997) y son altamente conservados filogenéticamente tanto en estructura como en función y se han identificado más de 400 proteínas con dominios PDZ en humanos (Sheng, 2001).

Las proteínas con dominios PDZ son proteínas de andamiaje que organizan complejos supramoleculares que participan en diversas funciones celulares como: señalización, tráfico vesicular, establecimiento y mantenimiento de la polaridad celular, migración celular dirigida, entre muchos otros. La organización de estos complejos se da por las interacciones entre el PDZbm de las proteínas a organizar y los dominios PDZ en las proteínas de andamiaje (Sheng, 2001).

Las interacciones PDZ-dependientes son de gran relevancia en varios procesos celulares y se sabe que algunas de estas interacciones son blanco de agentes patógenos, principalmente virales (Javier, 2011).

1.4 Los PDZbm de proteínas virales usurpan interacciones PDZ-dependientes del hospedero

Muchos virus producen proteínas con PDZbm que usurpan interacciones PDZ-dependientes del hospedero induciendo alteraciones que favorecen la permanencia de dichos virus, entre estos, el virus del papiloma humano (HPV), Adenovirus (Ad) y el virus linfotrópico de células T humanas (HTLV) (Javier, 2011). Por ejemplo, de manera normal en células epiteliales de mamífero, el segundo dominio PDZ de la proteína Disc Large 1 (DLG1) interacciona con el PDZbm del supresor de tumores Adenomatous Polyposis Coli (APC) (Figura 3). El complejo APC-DLG1 mantiene la polaridad de la célula y regula negativamente la progresión del ciclo celular desde Go/G1 a la fase S impidiendo así la proliferación celular (Zhenyi, 2011). La proteína viral E6 de HPV variedad 16 y 18, codifica un PDZbm que interfiere con esta interacción PDZ dependiente, induciendo la degradación de DLG1 en el proteosoma lo cual causa alteraciones en el ciclo celular, la polarización y proliferación de las células infectadas, promoviendo así la transformación de dicha célula (Figura 3) (Javier, 2008).

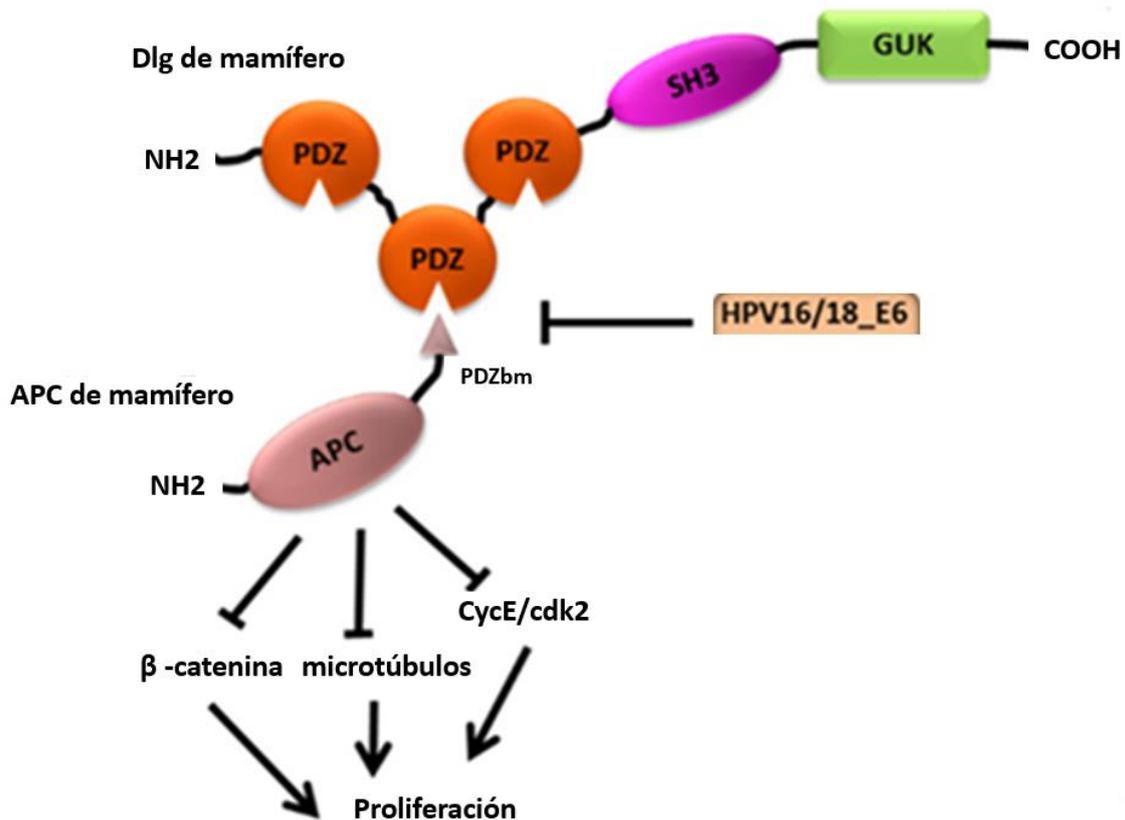


Figura 3. Se representa la proteína DLG1 con sus cinco dominios de interacción proteína-proteína, tres PDZ, un SH3 y un GUK. El segundo dominio PDZ de la proteína DLG1 interactúa con el PDZbm del supresor de tumores Adenomatous Polyposis Coli (APC). La proteína viral E6 de HPV, interfiere con esta interacción PDZ dependiente. (Modificado de Humbert, P. BioEssay, 2003).

En el caso de la proteína NS1 de IAV, la secuencia específica del PDZbm puede variar entre cepas sin embargo, la mayoría de los virus H3N2 de humano (95.73 %) expresan el PDZbm RSKV, mientras que en la mayoría de los virus H1N1 de humano (88.81 %) el PDZbm es RSEV. Por su parte, las proteínas NS1 del virus H5N1 de gripe aviar (76.93 %) tienen un PDZbm con la secuencia ESEV (Sevilla-Reyes, 2013).

Estas secuencias corresponden con el PDZbm de clase I, por lo que se ha predicho que NS1 de virus humanos y aviares se unirá a proteínas con dominios PDZ sin embargo, la secuencia específica del PDZbm

supone diferente especificidad o avidez de unión a estos dominios (Sheng 2001; Tonikian 2008).

Mediante el uso de genética reversa, se generaron virus isogénicos que contenían una secuencia consenso ESEV o RSKV en su PDZbm, de esta manera se demostró que el PDZbm humano y aviar son importantes determinantes de virulencia, y que el PDZbm aviar induce una mayor patología que el PDZbm de virus humanos H1N1. (Jackson, 2008).

NS1 a través de su PDZbm aviar ESEV, puede asociarse específicamente con las proteínas PDZ Scribble, DLG1, Guanilato cinasa asociada a la membrana con arreglo invertido (MAGI-1), MAGI-2, y MAGI-3 (Golebiewski, 2011). La interacción del PDZbm ESEV con Scribble en células epiteliales infectadas inhibe la función proapoptótica de Scribble y favorece la replicación de IAV (Liu, 2010).

También se ha reportado que la proteína PDLim2 (del inglés PDZ and LIM domain protein 2) interacciona *in vivo* con NS1 mediante PDZbm ESEV en células de mamífero. PDLim2 es expresada en células epiteliales y linfocitos para regular negativamente NF-κB en estos tejidos, sin embargo aún no se conoce la relevancia de su interacción con NS1 (Yu, 2011).

La barrera epitelial es una importante defensa contra las infecciones virales cuya integridad es mantenida por las proteínas de unión estrecha (Del inglés Tight junction). Durante una infección con IAV, el PDZbm ESEV interacciona con DLG1 y Scribble lo que desensambla las TJ por la alteración de la localización de las proteínas, ZO-1 y Ocludina y el decremento en la resistencia eléctrica transepitelial. La alteración de las TJ aumenta la permeabilidad de las células infectadas permitiendo el acceso del virus en la célula y la diseminación de la infección en el hospedero (Golebiewski, 2011).

1.5 Mutagénesis dirigida como herramienta para generar NS1 con diferentes PDZbm.

Hasta la fecha sólo se han identificado algunas proteínas PDZ blancos del PDZbm ESEV, sin embargo, aún no se han identificado proteínas PDZ blancos de los PDZbm de virus humanos RSKV y RSEV. Debido a que el PDZbm de NS1 de IAV es un determinante de virulencia, es de suma importancia describir las interacciones del PDZbm con proteínas con dominios PDZ aún no descritas.

En este trabajo se usó la técnica de mutagénesis dirigida, para generar plásmidos que codifican la proteína NS1 del virus de referencia H1N1 de influenza A aislado en Puerto Rico en 1934 (A/PR/8/34) modificadas exclusivamente en el PDZbm.

En la figura 4 se muestra la técnica de mutagénesis dirigida la cual permite insertar mutaciones específicas en sitios determinados en una cadena de DNA.

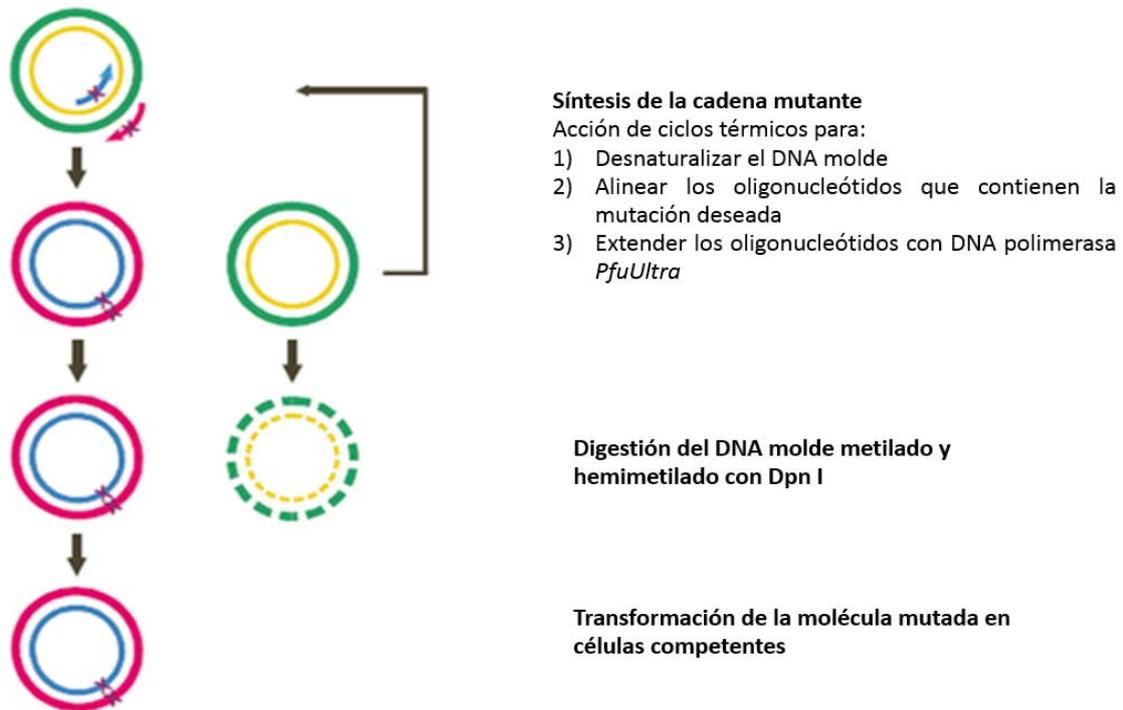


Figura 4. Método de mutagénesis dirigida del estuche comercial QuikChange II. Se muestran las cadenas sentido y antisentido del plásmido templado con un círculo verde y amarillo respectivamente. Las flechas azul y roja representan los oligonucleótidos sentido y antisentido que contienen la mutación deseada los cuales son complementarios entre sí y a cada una de las cadenas del plásmidos templado excepto en la mutación diseñada. Estos oligonucleótidos son elongados por medio de una polimerasa de alta fidelidad para incorporar la mutación deseada. El plásmido templado es comúnmente DNA aislado de bacterias, por lo que la enzima Dpn I que reconoce el DNA metilado y hemimetilado es usada para su eliminación.

El procedimiento utiliza un plásmido de DNA de doble cadena (dsDNA) y dos oligonucleótidos sintéticos de 25 a 45 bases que contienen la mutación deseada. Los oligonucleótidos deben ser complementarios entre sí y a su vez complementarios a su cadena opuesta en el plásmido templado, además deben tener una temperatura de fusión (T_m) ≥ 78 °C. La mutación deseada debe estar presente en ambos oligonucleótidos y flanqueada por 10-15 bases complementarias a la plantilla de DNA alrededor del sitio de la mutación; se recomienda

también que contengan dos o más nucleótidos G o C en su extremo 5'. La mutación puede ser un único cambio de base, múltiples cambios de bases, deleciones o inserciones.

Una vez que el DNA molde se desnaturaliza por medio del aumento de temperatura, los oligonucleótidos que contienen la mutación deseada deben hibridar con cada una de las cadenas de DNA desnaturalizado (sentido y antisentido). Ambas cadenas se elongan usando una DNA polimerasa de alta fidelidad, la cual incorpora la mutación deseada al DNA recién sintetizado.

El DNA usado como templado en las reacciones de mutagénesis, generalmente es un plásmido aislado de bacterias. Este DNA tiene la característica de ser metilado. La endonucleasa Dpn I tiene como blanco 5`-Gm⁶ATC-3` y es específica para DNA metilado y hemimetilado por lo que es usada después de los ciclos de reacción de mutagénesis para digerir el DNA templado. De esta forma, al eliminar el DNA molde se enriquece el plásmido con la mutación deseada, con éste se transforman bacterias competentes las cuales captan el DNA libre en el medio, el cual contiene la mutación deseada (Figura 4) (QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit).

Debido a que la proteína NS1 de IAV contiene un motivo PDZbm que es un determinante de virulencia, la generación de mutantes de NS1 con diferente especificidad en el PDZbm nos permitirá analizar qué proteínas del hospedero interaccionan con los diferentes PDZbm de NS1 y conocer más acerca de los mecanismos de patogenicidad del virus.

2. Hipótesis

La modificación de la secuencia PDZbm de NS1 de IAV para la obtención de las secuencias de virus humanos RSKV y RSEV, la secuencia de virus aviares ESEV, así como una secuencia AAAA que no es un PDZbm y un codón de paro temprano STOP que genera una proteína sin PDZbm, permitirá investigar las interacciones PDZ-dependientes de NS1 con proteínas PDZ del hospedero.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

- Realizar la mutagénesis dirigida del factor de virulencia NS1 de IAV para generar cuatro mutantes en el motivo PDZbm.

3.2 Objetivos particulares

- Efectuar reacciones de mutagénesis dirigida con las parejas de oligonucleótidos RSKV, ESEV, AAAA y STOP usando como DNA templado el vector pCMVmycNS1_FL.
- Comprobar mediante reacciones de secuenciación cada una de las mutaciones obtenidas.
- Comprobar la expresión de la proteína NS1 de cada uno de los mutantes.
- Caracterizar los mutantes por su interacción con Scribble.

4. Metodología

4.1 Plásmido y oligonucleótidos utilizados en la mutagénesis dirigida

Se utilizó como templado el plásmido pCMVMyc_NS1FL que codifica la proteína NS1 del virus de referencia A/PR/8/34, fusionada a una etiqueta de myc en su extremo amino-terminal. Esta proteína NS1 contiene el PDZbm con la secuencia consenso de virus humanos RSEV (Figura 5).

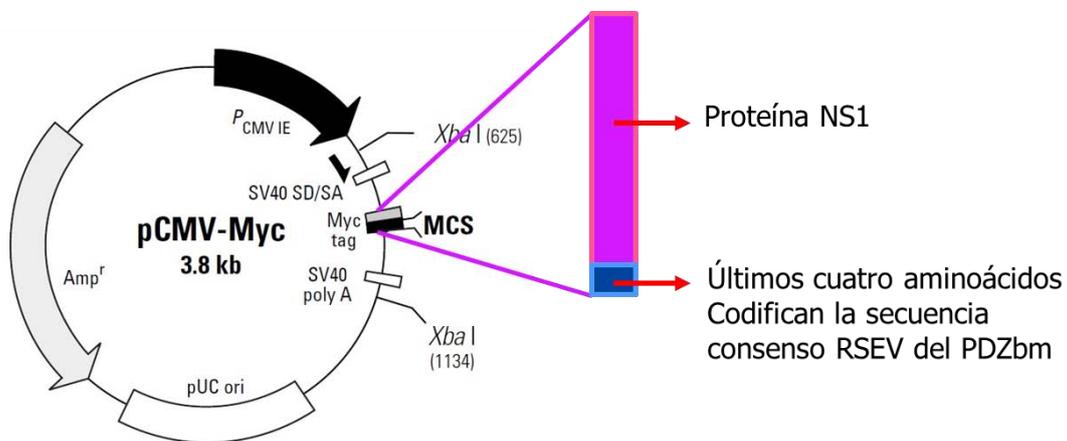


Figura 5. Plásmido templado pCMVMyc_NS1FL. Codifica el ORF de NS1 del virus de referencia A/PR/8/34 con el PDZbm correspondiente a la secuencia consenso de virus humanos RSEV.

Para diseñar los oligonucleótidos usados en las reacciones de mutagénesis, se obtuvo el ORF de NS1 del virus de referencia A/PR/8/34 de la base de datos NCBI (NC_002020.1) que consta de 693 bases, los cambios se realizaron en el intervalo de las posiciones 679-690, correspondientes al PDZbm de la proteína (Figura 6).

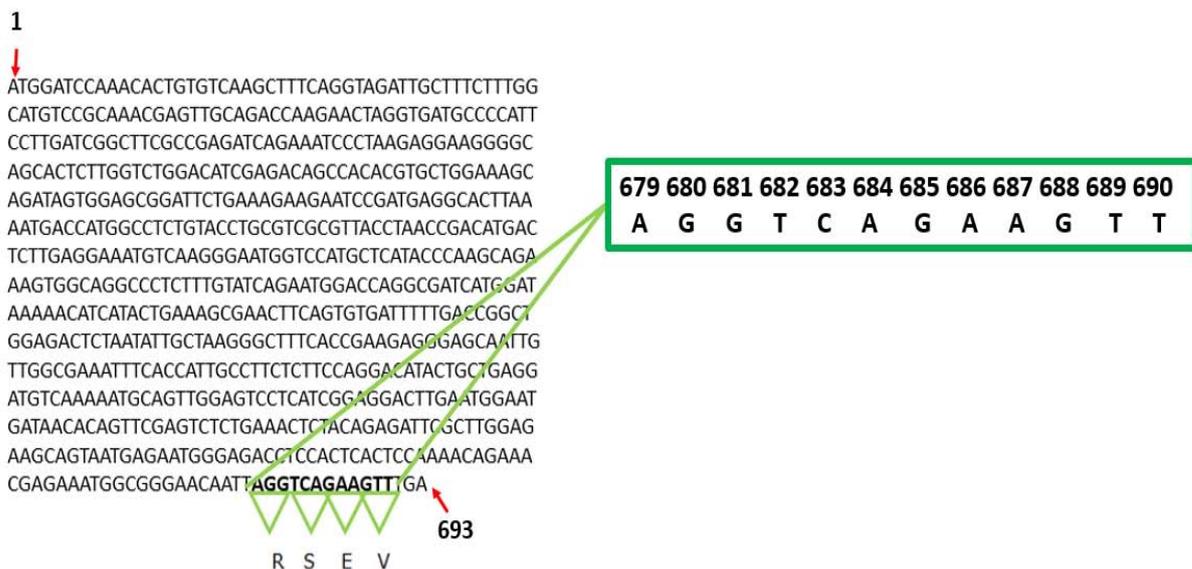


Figura 6. Secuencia codificante de NS1 del virus referencia A/PR/8/34. Se marca en verde el PDZbm de la proteína que corresponde con la secuencia consenso RSEV y las posiciones correspondientes en dicha secuencia.

En la tabla 1 se muestran los cambios de nucleótidos en posiciones específicas en la secuencia de NS1 de A/PR/8/34 requeridos para la obtención de cada uno de los mutantes en el PDZbm.

		Diseño de las mutaciones para obtener el respectivo PDZbm			
PDZbm del plásmido molde (aa 227-230)	Secuencia nucleotídica	STOP	AAAA	ESEV	RSKV
R	AGG	TAG	GCG	GAG	--
S	TCA	--	GCA	--	--
E	GAA	--	GCA	--	AAA
V	GTT	--	GCT	--	--

Tabla 1 . Posiciones y cambios realizados en la secuencia del plásmido molde RSEV para la obtención de cada uno de los mutantes.

Para realizar la mutagénesis dirigida se diseñaron pares de oligonucleótidos que contenían la mutación deseada y que cumplieron con los requerimientos del protocolo de mutagénesis (Ver apartado 1.5). Los oligonucleótidos se muestran en la tabla 2.

STOP	Secuencias
Oligonucleótido sentido	5'CGAGAAATGGCGGGAACAATT TA GTCAGAAGTTTGAAAGGG 3'
Oligonucleótido antisentido	5'CCCTTTCAAACCTTCTGAC TA AATTGTTCCCGCCATTTCTCG 3'
AAA	
Oligonucleótido sentido	5'-GAGAAATGGCGGGAACAATT GC G C AG C AG C TTGAAAGGGCGAATTCGGTCG-3'
Oligonucleótido antisentido	5'-CGACCGAATTCGCCCTTTCAAG CT G CT G C C G CAATTGTTCCCGCCATTTCTC-3'
RSKV	
Oligonucleótido sentido	5'-GCGGGAACAATTAGGTCA AAA AGTTTGAAAGGGCGAAT-3'
Oligonucleótido antisentido	5'-ATTCGCCCTTTCAAAC TT TGACCTAATTGTTCCCGC-3'
ESEV	
Oligonucleótido sentido	5'-CGAGAAATGGCGGGAACAATT GA GTCAGAAGTTTGAAAGGG-3'
Oligonucleótido antisentido	5'-CCCTTTCAAACCTTCTGAC TC AATTGTTCCCGCCATTTCTCG-3'

Tabla 2. Oligonucleótidos empleados en cada una de las reacciones de mutagénesis dirigida. En color azul se señalan las bases que constituyen los cambios en cada una de las secuencias.

4.2 Reacciones de mutagénesis dirigida

4. 2. 1 Progreso de la reacción

Se utilizó el estuche comercial QuikChange II Site-Directed Mutagénesis Kit de Agilent Technologies para mutagénesis dirigida.

Se montó una reacción como control positivo de la mutagénesis utilizando 10 ng del plásmido control pWhitescript, según las especificaciones del fabricante.

Reacción control	1 reacción
Solución de reacción 10X	5 µL
Plásmido control 4.5kb (5 ng/ µL)	2 µL
Oligonucleótido control #1 (100 ng/µL)	1.25 µL
Oligonucleótido control #2 (100 ng /µL)	1.25 µL
Mezcla de DNTPs	1 µL
Agua	38.5 µL
DNA polimerasa HFDNA (2.5u/µL)	1 µL

Se realizaron dos reacciones de mutagénesis por cada pareja de oligonucleótidos, una con 10 y otra con 25 ng de oligonucleótidos de acuerdo al protocolo sugerido por el fabricante.

	1 reacción
Solución de reacción 10X	5 µL
DNA templado (533 ng/ µL)	0.189 µL
Oligonucleótido sentido	10 y 25 ng
Oligonucleótido antisentido	10 y 25 ng
Mezcla de dNTPs	1 µL
Agua	Lo que baste para 50 µL
DNA polimerasa HFDNA (2.5u/µL)	1 µL

Las reacciones se introdujeron en el termociclador con el siguiente esquema de amplificación:

Pasos	Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	1	95 °C	30 segundos
2	18	95 °C	30 segundos
		55° C	1 minuto
		68 °C	5 minutos

Concluidos los ciclos, se agregó 1 μL de Dpn I a cada reacción y se introdujeron nuevamente en el termociclador con el siguiente esquema:

Pasos	1 ciclo	
1	37 °C	60 minutos
2	4 ° C	∞

4.2.2 Transformación de células competentes

Se transformaron 50 μL de células competentes (XL-1 Super Blue) utilizando 1 μL de cada una de las reacciones de mutagénesis dirigida, de la siguiente manera: Una vez descongeladas, las bacterias competentes se mezclaron con el DNA de cada una de las reacciones de mutagénesis y se incubaron en hielo durante 5 minutos. Se dio un choque térmico a 42 °C durante 30 segundos y se colocaron nuevamente en hielo por 2 minutos.

Se agregó medio S.O.C (500 μL) a cada uno de los tubos y se incubaron durante 1 hora a 37 °C con agitación de 225-250 rpm.

En diferentes placas de agar con ampicilina como antibiótico de selección, se plaquearon 250 μL de cada uno de los cultivos y se incubaron a 37 °C por 16 horas. Sólo para la reacción control se extendió IPTG 10mM (100 μL) y Xgal al 2% (100 μL) sobre las placas para selección de colonias azules y blancas. Las placas se incubaron todas la noche.

4.2.3 Purificación del plásmido

Se picaron 5 colonias de cada reacción de mutagénesis dirigida y cada una se inoculó en 3 mL de medio LB líquido con ampicilina (10

$\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Se incubaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ con agitación a 250 rpm durante 16 horas.

Se utilizó un estuche comercial de Invitrogen (K2100-10) para la purificación del DNA plasmídico por centrifugación.

Se tomaron 2mL de cada uno de los cultivos anteriores y se colocaron en microtubos. Se centrifugaron a 10000 rpm durante 10 minutos para obtener el paquete bacteriano.

Se eliminó el sobrenadante y se agregaron 250 μL de solución de resuspensión (R3) para resuspender el botón bacteriano y las células se lisaron con 250 μL de solución de lisis (L7). Se mezcló gentilmente por inversión y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se añadieron 350 μL de solución de precipitación (N4), se mezcló por inversión y se centrifugó el lisado a 14000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se cargó en una columna que se centrifugó a 12000 rpm durante 1 minuto para unir el DNA a la resina contenida en la columna. Se eliminó el sobrenadante y se lavó la columna con 700 μL de solución de lavado (W9, adicionada con etanol). Se centrifugó a 14000 rpm durante 1 minuto, se descartó el sobrenadante y se repitió la centrifugación.

Se adicionó 35 μL de agua estéril y se incubó a temperatura ambiente durante 1 minuto. Se centrifugó a 14000 rpm durante 2 minutos para eluir el DNA que se cuantificó mediante espectrofotometría.

El plásmido aislado se almacenó a -20°C .

4.3 Comprobación de la mutagénesis mediante secuenciación.

Se realizó la secuenciación de los mutantes obtenidos mediante el método de Sanger en la unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

El oligonucleótido empleado para secuenciar y verificar las mutaciones fue:

Oligonucleótido pCMV Myc rev:

5'-GATCCGAAAAACCTCCCACACCTCC-3'

Este oligonucleótido es una secuencia complementaria al vector de clonación río abajo del ORF de NS1 (Figura 5). Durante la secuenciación, la cadena sintetizada es la reversa complementaria.

4.4 Comprobación de la expresión de los mutantes

4.4.1 Cultivo de células HeLa

Se descongeló una alícuota de células HeLa criopreservadas con anterioridad. Las células se cultivaron en botellas T-75 con medio DMEM (LONZA, Walkersville, MD USA) completo adicionado con 10% de suero fetal bovino (SFB), glutamina 200 mM, penicilina 100U/mL y estreptomycin 100µg/mL (medio DMEM completo) a 37 °C y 5% de CO₂. Cuando las células alcanzaron un 100% de confluencia, se lavaron con solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) y se les añadió tripsina (0.25 %; LONZA, Walkersville, MD USA) que permite separar las células de su soporte de cultivo. El cultivo se resuspendió en medio DMEM completo. Las células se sembraron a una confluencia aproximadamente del 40% en placas de 6 pozos con 4 mL de medio DMEM completo por pozo y se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂. A las

24 horas se tenían los pozos al 80% de confluencia listos para su transfección.

4.4.2 Transfección de células HeLa

Se utilizó el reactivo para transfección, TurboFect (Thermo Scientific). Para cada transfección se preparó una mezcla con 400 μ L de medio de DMEM sin suero y 4 μ g de cada uno de los plásmido, STOP, AAAA, RSKV, ESEV plásmido templado pCMVMyc_NS1FL (NS1FL) o el plásmido vacío (Myc).

El TurboFect se agitó en el vórtex y se añadió 6 μ L a cada mezcla de plásmido y se incubó 15 minutos a temperatura ambiente.

Se tomó la placa de 6 pozos al 80% de confluencia y se le añadió gota a gota una mezcla diferente a cada pozo, la placa se incubó a 37°C y 5% de CO₂ durante 24 horas.

4.4.3 Extracción y cuantificación de proteína

A las 24 horas de la transfección, se recolectaron las células HeLa de cada pozo mediante un tratamiento con tripsina. Se obtuvieron 6 botones celulares que se lisaron con 200 μ L de amortiguador RIPA (Sigma) con 1% de inhibidor de proteasas (Amersham) y se incubaron durante 15 minutos en hielo. Se centrifugaron a 15000 rpm durante 15 minutos a 4°C.

Se recolectó el sobrenadante y se cuantificó la proteína total en cada uno de los lisados con un estuche de cuantificación de proteínas (DC Protein Assay - Bio-Rad) de acuerdo al protocolo del fabricante. Se realizó la curva de calibración con albúmina sérica bovina (BSA). Se agregó amortiguador de carga (Laemmil buffer Bio Rad) en dilución

1:2. Las muestras se incubaron a 95°C durante 5 minutos y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

4.4.4 Electroforesis, electrotransferencia e inmunodetección (Western Blot - WB)

Se realizó una electroforesis para separar las proteínas del lisado total por peso molecular en condiciones desnaturalizantes. Se hicieron dos geles de poliacrilamida al 12% y se cargaron 20 µg de proteína total de cada una de las muestras por pozo. La separación se realizó con una solución amortiguadora de corrida 1X aplicando un voltaje constante (90V) durante aproximadamente 2 horas.

Las proteínas separadas en los geles se transfirieron a dos membranas de nitrocelulosa (Supported Nitrocellulose Membrane – Bio Rad), en presencia de una solución amortiguadora de transferencia 1X, aplicando un voltaje constante de 100V durante 1 hora.

Las membranas se bloquearon con una solución salina amortiguadora tris (TBS) 1X con 5% de leche durante 1 hora. Se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con una solución salina amortiguadora tris con tween 20 (TBS-T). Una de las membranas se incubó con el anticuerpo primario anti-myc (cell signaling 1:1000) y la otra con anti-β-actina (donado por el Dr. Manuel Hernández Hernández del Departamento de Biología Celular del CINVESTAV unidad Zacatenco) en TBS-T con leche al 1% durante 1 hora. Se lavaron 3 veces con TBS-T.

Se incubaron con un anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a peroxidasa (HRP) (cell signaling 1:3000) en TBS-T con leche al 1% durante 1 hora y se lavó 3 veces con TBS-T.

Se realizó el revelado de las membranas por quimioluminiscencia en un fotodocumentador Bio Rad con un reactivo luminol (Millipore Immobilon Western Chemiluminescent HRP).

4.5 Caracterización de los mutantes por inmunoprecipitación

Se transfectaron células HeLa con los diferentes mutantes como en el apartado anterior. Se obtuvieron los botones celulares y se lisaron con solución de lisis NP40 (con 1% de inhibidor de proteasas y 1% de inhibidor de fosfatasa). Se cuantificó proteína total como en el apartado anterior.

Se incubaron 200µg de proteína de cada muestra con 5µL de anticuerpo anti-myc (cell signaling) a 4°C durante toda la noche (ON) con rotación constante. Se añadieron 20 µL de perlas de sepharosa-proteína G (Santa Cruz) bloqueada con BSA a cada uno de los tubos y se incubaron a 4°C durante 2 horas con rotación constante. Se hicieron 5 lavados con solución de lisis por centrifugación a 1600 rpm durante 1 minuto cada vez y quitando el sobrenadante sin perturbar el paquete de perlas, se realizó un último lavado con solución de PBS al 1X. Se quitó el sobrenadante, se agregó amortiguador de carga Laemmli (Laemmli Sample Buffer – Bio Rad) y se centrifugó a velocidad máxima. Las muestras se incubaron a 95°C durante 5 minutos y se almacenaron a -20 °C.

Se realizó una electroforesis, electrotransferencia e inmunodetección de dos membranas. Una de las membranas se incubó con un anticuerpo anti-myc (cell signaling 1:1000) durante 1 hora y con un anticuerpo secundario anti-ratón (cell signaling 1:3000), mientras que la otra membrana fue incubada con un anti- Scribble (cell signaling 1:1000) y con un anticuerpo secundario anti-conejo (cell signaling 1:3000) durante 1 hora y posteriormente se lavaron 3 veces con TBS-T. Las membranas fueron reveladas.

5. Resultados y discusión

5.1 Generación de los mutantes y obtención de los plásmidos

Las reacciones de mutagénesis dirigida se utilizaron para transformar células competentes XL-1 Super Blue, para después obtener el plásmido purificado.

En la transformación de células competentes, cada uno de los plásmidos que contienen las secuencias con las mutaciones deseadas se introducen en las bacterias tratadas para ser especialmente permeables a la entrada de plásmidos. Esta permeabilidad se debe a alteraciones que sufre la membrana celular cuando las bacterias son colocadas en soluciones de CaCl_2 (Cloruro de Calcio) que por mecanismos desconocidos favorece la absorción y captación de DNA exógeno (Bruce, 1978). Cuando la mezcla de plásmido mutagenizado-bacterias se somete a choque térmico, se facilita la entrada de plásmidos a las células.

En la reacción control del estuche QuikChange II Site-Directed Mutagénesis, se emplea el plásmido fue pWhitescript, éste es usado para verificar la eficiencia de la reacción de mutagénesis. Este plásmido **contiene un codón STOP (TAA) en el gen de la β -galactosidasa (β -gal)**. Los oligonucleótidos control están diseñados para inducir una mutación puntual que cambia la T del condón STOP por una C, lo que da lugar al codón CAA de la glutamina **y restituye el ORF de β -gal**, por lo que en las bacterias transformadas se da lugar a la expresión del gen de la β -gal.

El IPTG **es un inductor de β -gal** mientras que X-gal es un sustrato que puede ser hidrolizado por esta enzima produciendo un compuesto azul insoluble. Las bacterias que fueron transformadas con la reacción

control de la mutagénesis adquirieron un genotipo β -gal positivo dando lugar a un fenotipo de color azul en un medio que contiene IPTG y X-gal (Tabla 3).

Esto indica que el estuche utilizado es eficiente en la generación de plásmidos mutagenizados.

El plásmido templado usado en las reacciones de mutagénesis dirigida, pCMVMyc_NS1FL (Figura 3), carece del gen β -gal pero sí codifica un gen de resistencia a ampicilina. Las bacterias que fueron capaces de adquirir el plásmido del medio, crecieron en un medio adicionado con ampicilina (Tabla 3), sin embargo, para saber si el plásmido captado es el que tiene la mutación deseada es necesaria la comprobación de la mutagénesis por secuenciación.

Plásmido	Crecimiento de colonias azules (medio de crecimiento adicionado con IPTG y X-gal)
pWhitescript (plásmido control del estuche QuikChange)	+++
	Crecimiento de colonias (medio de crecimiento adicionado con ampicilina)
STOP	+++
AAAA	++
RSKV	+++
ESEV	+++

Tabla 3. Crecimiento de colonias azules en un medio adicionado con IPTG y X-gal en la reacción control, indica que el estuche utilizado es eficiente en la generación de plásmido mutante. Crecimiento de colonias en medio adicionado con ampicilina indica que las células fueron transformadas con cada uno de los plásmidos. +++ Crecimiento abundante (300-100 colonias). ++ Buen crecimiento (entre 100 y 50 colonias). + Poco crecimiento (menos de 50 colonias).

Una vez obtenido el plásmido purificado, se cuantificó mediante espectrofotometría (Tabla 4). Los nucleótidos, RNA, ssDNA y dsDNA absorben luz UV a 260 nm. La relación de absorbancia a 260 y 280 nm se utiliza para evaluar la pureza de DNA. Un valor de 1.8 es **generalmente aceptado como un "DNA puro"**, si la relación es inferior puede indicar la presencia de proteínas. Los valores de la relación de absorbancia 260 y 230 nm comúnmente son observados en el intervalo de 2.0-2.2. Si la proporción es inferior, indica la presencia de contaminantes como solventes (Nanodrop Technologies, 2007).

En la tabla 4 se muestra la concentración de cada uno de los plásmidos así como los índices 230/260 y 260/280. Se puede apreciar que los **plásmidos aislados cumplen con la característica de ser un DNA "puro"** y libre de contaminantes como solventes, lo cual será importante ya que en una reacción de secuenciación, la calidad de los datos obtenidos depende en gran medida de la pureza y correcta cuantificación de las muestras de DNA analizadas.

Plásmido	Colonia número	Cuantificación (ng/ μ L)	Índice 230/260	Índice 260/280
STOP	1	136.2	2.27	1.90
	2	183.3	2.30	1.91
	3	471.5	2.28	1.85
	4	373.4	2.26	1.85
	5	531.6	2.27	1.83
AAAA	1	384.4	2.30	1.86
	2	572.4	2.26	1.81
	3	473.3	2.25	1.84
	4	426.6	2.26	1.84
	5	483.9	2.26	1.81
RSKV	1	538.0	2.25	1.85
	2	286.4	2.25	1.85
	3	472.2	2.28	1.84
	4	453.1	2.26	1.83
	5	563.3	2.23	1.83
ESEV	1	478.3	2.28	1.85
	2	381.9	2.26	1.84
	3	436.4	2.29	1.84
	4	478.6	2.25	1.82
	5	495.9	2.25	1.83

Tabla 4. Cuantificación e índices 230/260 y 260/280 de cada una de las cinco colonias de las reacciones de mutagénesis.

5.2 Caracterización de los mutantes

5.2.1 Secuenciación

Los plásmidos obtenidos de las cinco colonias de cada una de las reacciones de mutagénesis se analizaron mediante el método de secuenciación de Sanger en la unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

El método de Sanger emplea una DNA polimerasa que copia la cadena molde ssDNA en presencia de el oligonucleótido pCMV Myc rev (ver metodología 4.2), junto con una mezcla de reacción que contiene desoxinucleótidos (dNTP) y didesoxinucleótidos (ddNTP). Se llevan a cabo cuatro reacciones en paralelo, cada una de las cuales contiene un ddNTP con un marcador fluorescente (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP). La DNA polimerasa es capaz de incorporar el ddNTP correspondiente **en la cadena que se sintetiza, pero como éste carece de extremo 3'-OH**, la enzima es incapaz de unirle el siguiente nucleótido y por consiguiente la reacción termina. En cada uno de los tubos se producirán cadenas de DNA de distintas longitudes, terminando todas en el lugar en el que se incorporó el correspondiente ddNTP (Sanger, 1977).

Los fragmentos de DNA marcados con colorantes se separan con base en su tamaño por electroforesis capilar y se leen utilizando un sistema óptico. Esta lectura se traduce en un electroferograma en el cuál se representa la base correspondiente a cada posición de la cadena de DNA.

Mediante el programa MEGA6 se analizaron las secuencias obtenidas. La secuencia obtenida corresponde con la secuencia antisentido dado el diseño del oligonucleótido para la secuenciación, por lo que fue

necesario obtener la secuencia reversa complementaria para poder analizar los resultados (ver metodología 4.2).

En la figura 7 se muestra el electroferograma del mutante STOP. El codón de paro temprano introducido en la mutagénesis está codificado por la secuencia de nucleótidos TAG en la posición 679-681, lo que impedirá la traducción del PDZbm.

Los aminoácidos codificados por cada codón están marcados debajo de la secuencia de nucleótidos.

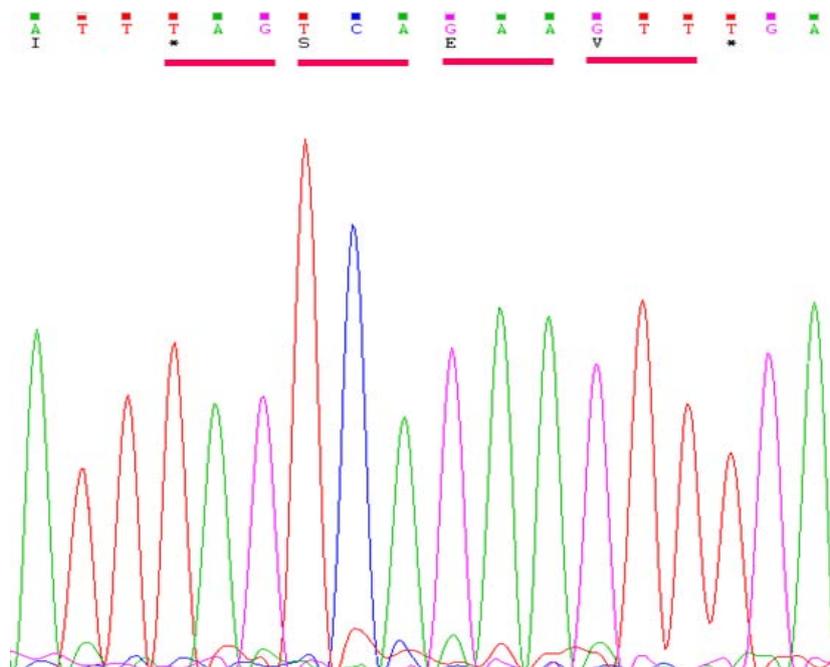


Figura 7. Electroferograma de la secuencia STOP generada por la introducción de un codón TAG en la posición 679-681 del ORF de la proteína NS1 de IAV.

El siguiente electroferograma (Figura 8) muestra la secuencia del mutante AAAA. Se pueden observar que la mutagénesis se llevó a cabo adecuadamente y generó cuatro codones que codifican alanina, esta secuencia no corresponde a un PDZbm.

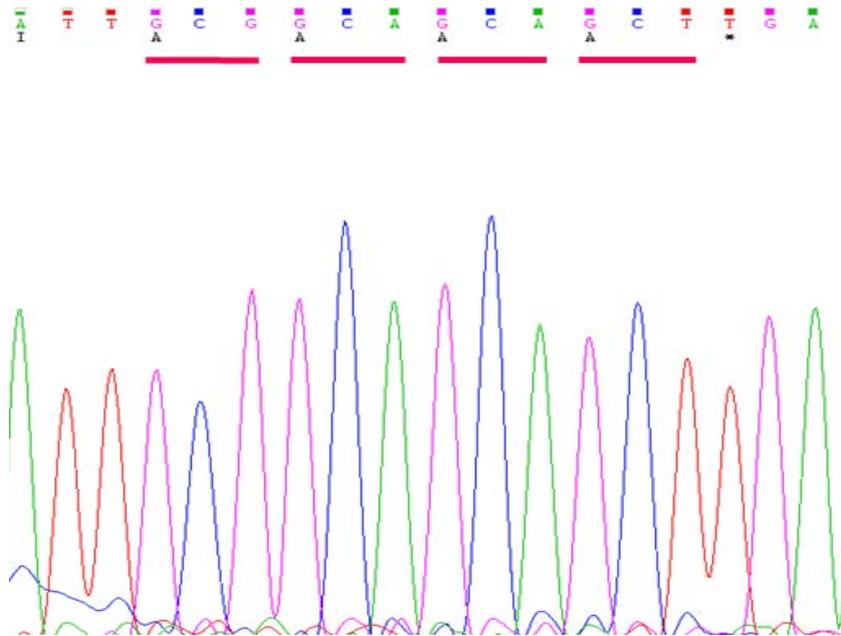


Figura 8. Electroferograma de la secuencia AAAAA en el PDZbm de NS1 de IAV. El codón 227 se mutó de AGG a GCG, el 228 de TCA a GCA, el 229 de GAA a GCA y el 230 de GTT a GCT. Estos cuatro codones correspondientes a los aa 679-690 los cuales codifican alanina.

El siguiente electroferograma corresponde a la reacción de mutagénesis para la generación de la secuencia RSKV de virus humanos H3N2 (Figura 9).

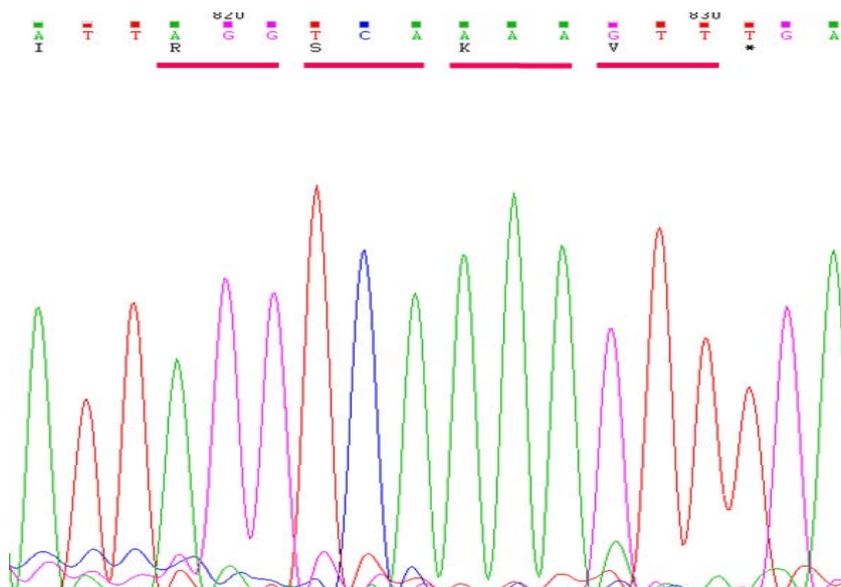


Figura 9. Electroferograma de la secuencia RSKV en el PDZbm de NS1 de IAV. El codón 229 se mutó de GAA a AAA.

A continuación se muestra el electroferograma correspondiente a la secuencia con la mutación ESEV, el PDZbm de los virus aviáres (Figura 10).

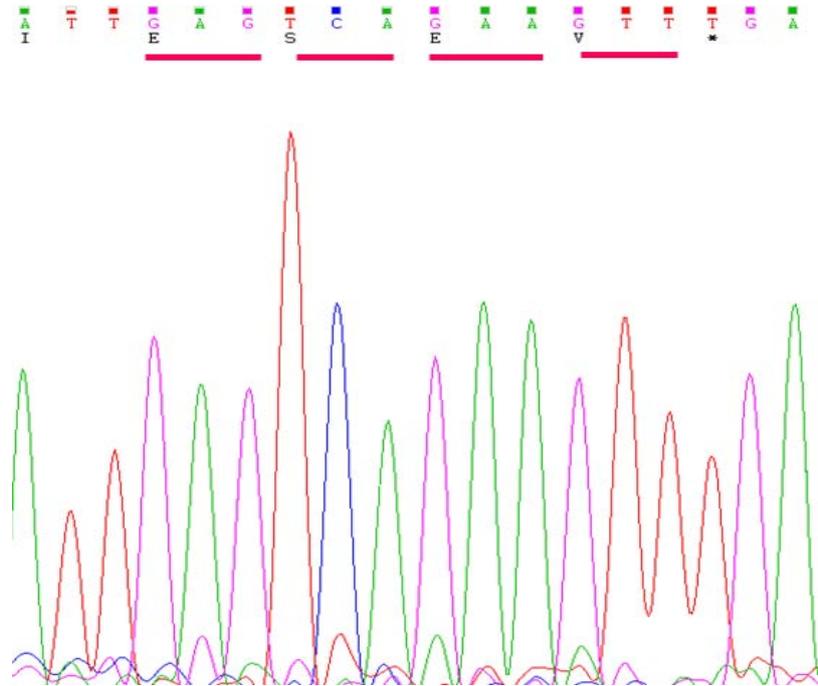


Figura 10. Electroferograma de la secuencia ESEV en el PDZbm de NS1 de IAV. El codón 227 se mutó de AGG a GAG.

Posteriormente se realizó un alineamiento con MEGA6 para poder comparar las diferentes secuencias obtenidas y comprobar que sólo ocurrieron los cambios deseados (Tabla 1) y el resto de la secuencia permaneció idéntica entre los mutanes (Figura 11).

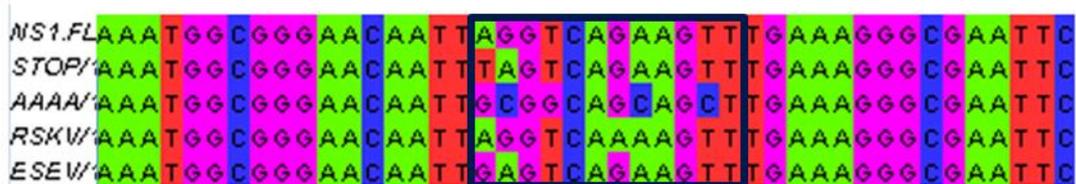


Figura 11. Alineamiento de las secuencias mutantes generadas

La comprobación de las secuencias mutantes obtenidas, da cuenta del resultado exitoso en la reacciones de mutagénesis y garantiza la

confiabilidad de los datos que se obtendrán al analizar las interacciones PDZ-dependientes de NS1 en proteínas de humano.

5.2.2 Expresión de las proteínas NS1 mutantes

Para comprobar la expresión de los diferentes mutantes de la proteína NS1, se transfectó cada uno de los plásmidos mutantes en células HeLa. La transfección se realizó con el reactivo turboFect, el procedimiento se basa en la formación de complejos de lípidos catiónicos con el DNA. Estos complejos protegen al DNA de la degradación y facilitan el suministro eficiente del plásmido en las células eucariontas (Life Technologies, 2015).

Se extrajeron las proteínas totales de los cultivos previamente transfectados y fueron cuantificadas mediante un ensayo colorimétrico (Tabla 5). La cuantificación es importante para asegurar que la cantidad de muestra usada en los ensayos de WB sea la misma, ya que de esta manera se puede comparar el nivel de expresión de las proteínas de cada uno de los mutantes.

Proteínas totales obtenidas de las células transfectadas con cada uno de los plásmidos	Concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
STOP	1.4229
AAAA	0.9146
RSKV	0.8396
ESEV	1.0109
NS1FL	0.0954
Myc	1.0354

Tabla 5. Cuantificación de las proteínas totales obtenidas de la lisis de las células HeLa 24h después de ser transfectadas con cada uno de los plásmidos.

En el ensayo de WB detectamos la expresión de los mutantes de la proteína NS1 mediante el reconocimiento de la etiqueta de myc a la que están fusionadas las proteínas. Se utilizó un anticuerpo primario anti-myc hecho en ratón y el anticuerpo secundario usado fue un anti-ratón acoplado a HRP que degrada el luminol produciendo emisión de fotones que pueden ser detectados dando lugar a una señal visible.

En la figura 12 se muestran las bandas reveladas por quimioluminiscencia. En el carril marcado como NS1FL se observa la expresión de la proteína NS1 con PDZbm RSEV correspondiente al ORF de NS1 del virus de referencia A/PR/8/34 cuyo plásmido se usó como templado para la generación de los mutantes, dicho carril fue usado como control positivo. En el caso del carril marcado como Myc, la banda no pudo ser visualizada ya que, debido a su peso molecular, no se retiene en el gel de electroforesis, dicho carril fue tomado como control negativo del experimento pues en este no debe observarse la banda de 27 kDa.

Como se puede apreciar, en las células transfectadas con cada uno de los plásmidos que contienen las secuencias mutantes STOP, AAAA RSKV o ESEV, se expresó adecuadamente la correspondiente proteína NS1 mutada fusionada a la etiqueta de myc que tiene un peso aproximado de 27 kDa (Hale, 2008).

La expresión de β -actina de 42 kDa (Romero- Calvo, 2010) fue usada como control de carga ya que esta proteína se expresa normalmente en las células HeLa. La detección de β -actina nos asegura que en todos los carriles se cargó aproximadamente la misma cantidad de proteína y nos confirma que en el control negativo no se observa una banda en el WB revelado con anti-myc debido a la falta de expresión de NS1 y no por la ausencia de muestra, lo cual valida el experimento.

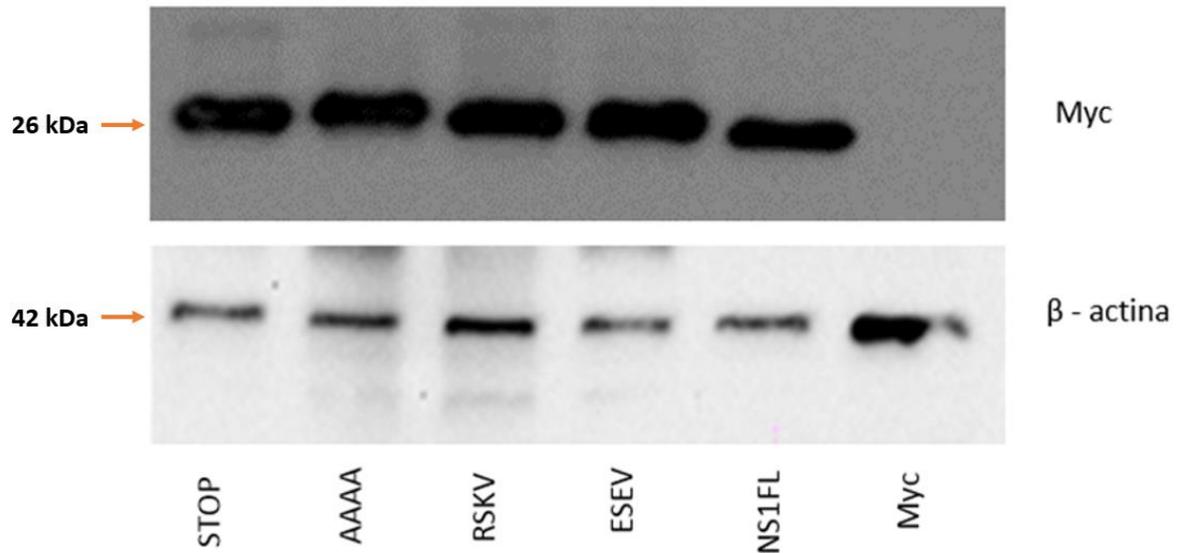


Figura 12. Expresión de cada uno de los mutantes revelados con anti- myc y control de carga revelado con anti- β - actina. En cada carril se cargaron 20 μ g de proteína total

Los resultados de WB revelan que el nivel de expresión de la proteína NS1 en cada uno de los mutantes es similar, por lo que cuando se realicen los ensayos funcionales, las diferencias observadas se deberán a la especificidad del PDZbm y no a una diferencia en el nivel de expresión de las proteínas mutantes.

5.2.3 Inmunoprecipitación

Mediante un ensayo de IP se precipita una proteína a partir de una mezcla en solución, utilizando un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno de la proteína de interés. En condiciones de baja astringencia la proteína de interés aislada puede revelar su interacción específica con otras proteínas que vienen asociadas a ésta en un mismo complejo, lo cual se puede analizar mediante un ensayo de WB (Kuo, 1999). Realizamos este ensayo para inmunoprecipitar NS1 usando un anticuerpo anti- myc.

Las células HeLa expresan la proteína PDZ Scribble, por ello esta línea celular se utilizó para transfectar los mutantes y buscar la interacción de las proteínas NS1 con Scribble.

Se transfectaron células HeLa con los diferentes mutantes como en el experimento anterior e igualmente se cuantificó la proteína total en los lisados usando el mismo método.

Proteínas totales obtenidas de las células transfectadas con cada uno de los plásmidos	Concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
STOP	1.24
AAAA	1.57
RSKV	1.46
ESEV	1.27
NS1FL	1.59
Myc	1.98

Tabla 6. Cuantificación de las proteínas totales obtenidas de la lisis de las células HeLa 24h después de ser transfectadas con cada uno de los plásmidos.

En la Figura 13 podemos observar los resultados de la IP. En la membrana revelada con el anticuerpo anti- myc, se observan las bandas a la altura de 27KDa correspondientes a las proteínas NS1 fusionadas a myc lo que indica que la IP fue exitosa. Además de la banda correspondiente a NS1, se observa una banda adicional de menor tamaño (25 kDa), esta banda pudo ser detectada debido a que el anticuerpo usado para revelar el WB y el usado para inmunoprecipitar están hechos en ratón, adicional a esto, el anticuerpo secundario es capaz detectar la cadena pesada (55 kDa) y la ligera (25 kDa), esta última al ser conservada en todos los anticuerpos logró ser detectada en ambos anticuerpos.

En la segunda membrana se realizó una inmunodetección con un anticuerpo anti-scribble para detectar la asociación de ésta a la proteína NS1 inmunoprecipitada. En la figura 13 se observa la banda que corresponde a la proteína Scribble endógena asociada sólo a la a la proteína NS1 con el PDZbm de los virus aviares ESEV, de acuerdo a lo publicado por Liu en 2010.

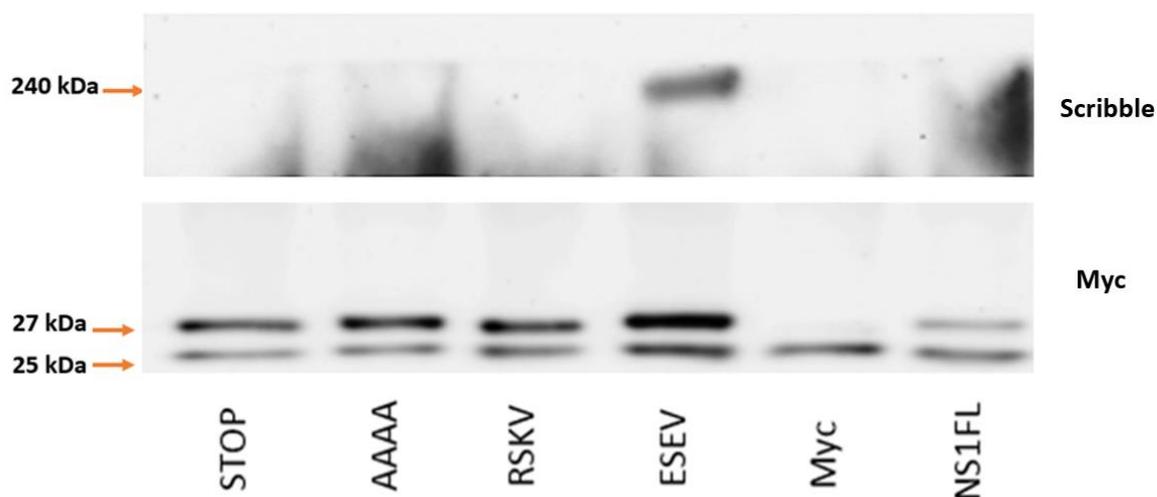


Figura 13. IP de cada uno de los mutantes. En el panel inferior se muestra la membrana revelada con anti-myc en la que se observa la expresión de las proteínas NS1 y la cadena ligera del anticuerpo usado en la IP. En el panel superior se observa una banda correspondiente a la proteína Scribble asociada a la proteína NS1 con el PDZbm ESEV.

Estos resultados nos confirma que las secuencias mutantes generadas son funcionales, es decir, los cambios generados por mutagénesis dirigida reproducen la interacción entre el PDZbm ESEV con Scribble reportada por Liu en 2010. Por lo tanto los mutantes generados son adecuados para el estudio de las interacciones de las diferentes secuencias consenso del PDZbm y sus especificidades con las proteínas PDZ.

Los dominios PDZ son dominios de interacción proteína-proteína presentes en proteínas adaptadoras capaces de ensamblar complejos multiproteicos en sitios subcelulares específicos coordinando así procesos tan importantes como: mantenimiento de la polaridad y morfología celular, tráfico vesicular, coordinación de la señalización intracelular, entre otros. La organización de estos complejos se da por las interacciones entre el PDZbm de las proteínas a organizar y los dominios PDZ en las proteínas de andamiaje (Sheng, 2001). Muchos patógenos, principalmente virales, producen proteínas con PDZbm que pueden usurpar interacciones PDZ-dependientes del hospedero, induciendo alteraciones que favorecen la permanencia de dichos patógenos (Javier, 2011).

La proteína NS1 de IAV tiene un motivo PDZbm, la secuencia específica del PDZbm supone diferente especificidad o avidéz de unión a estos dominios (Sheng 2000; Tonikian 2008). En este trabajo generamos mutantes de NS1 con diferentes secuencias en su PDZbm lo que es fundamental para estudiar las interacciones que establece NS1 a través de su PDZbm con proteínas humanas y cómo afectan estas interacciones la función de éstas células.

6. Conclusiones

- ✓ La mutagénesis dirigida es una técnica muy poderosa mediante la cual generamos cuatro mutantes en el motivo PDZbm del factor de virulencia NS1 del virus de influenza A.
- ✓ La caracterización de los mutantes por secuenciación, expresión e inmunoprecipitación nos confirma que estas construcciones pueden ser usadas en la búsqueda de proteínas PDZ humanas blanco de influenza A, así como en análisis funcionales de dichas interacciones.

7. Bibliografía

Bruce Molholt, J. D. **(1978)** Increased transformation frequency in *E. coli*. *Biochemical and biophysical Research Communication*. **82** (2) 477-483.

Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. **(1975)**. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 72(9): 3666-70.

Daviña- Núñez, Matthias- Budt, Thorsten- Wolff. **(2012)**. Análisis molecular de la ubiquitinación de RIG-I en el contexto de la infección por el virus Influenza. *FG17 Influenza/Respiratorische Viren*, Robert Koch-Institut, Nordufer 20 D-13353 Berlin.

Ehrhardt C. and Ludwig S. **(2009)**. A new player in a deadly game: Influenza viruses and the PI3K/Akt signalling pathway. *Cell Microbiol*, **11**(6): 863-871.

Einhauer, A.; Jungbauer, A. **(2001)**. "The FLAG™ peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins". *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **49** (1-3): 455-65. doi:10.1016/S0165-022X(01)00213-5. PMID 11694294.

Golebiewski L, Liu H, Javier RT. **(2011)** The avian influenza virus NS1 ESEV PDZ binding motif associates with Dlg1 and Scribble to disrupt cellular tight junctions. *J Virol*. **85**(20):10639-48.

Hale BG, Randall RE, Ortín J and Jackson D. **(2008)**. The NS1 multifunctional protein of influenza A viruses. *J Gen Virol*. **89**: 2359-2376.

Jackson D, Hossain MJ, Hickmann D, Perez DR and Lamb RA. (2008). A new influenza virus virulence determinant: The NS1 protein four C-terminal residues modulate pathogenicity. PNAS. **105** (11): 4381-86.

Javier, RT. (2008). Cell polarity proteins: common targets for tumorigenic human viruses. *Oncogene*. 27: 7031-7046.

Javier, RT, Rice AP. (2011). Emerging theme: cellular PDZ proteins as common targets of pathogenic viruses. J Virol. Nov; 85(22): 11544-56. doi: 10.1128/JVI.05410-11.

Kuo MH, Allis CD. (1999). In vivo cross-linking and immunoprecipitation for studying dynamic Protein: DNA associations in a chromatin environment. **19**(3):425-33.

Life Technologies (2015). [en línea] TurboFect Transfection Reagents. Disponible: <http://www.lifetechnologies.com/mx/es/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/thermo-scientific-molecular-biology-products/turbofect.html>.

Liu H, Golebiewski L, Dow EC, Krug RM, Javier RT and Rice AP. (2010). The ESEV PDZ-binding motif of the avian influenza A virus NS1 protein protects infected cells from apoptosis by directly targeting scribble. J Gen Virol. **84**(21): 11164-11174.

Medina RA, García-Sastre A. (2011). Influenza A viruses: new research developments. Nat Rev Microbiol. 2011 Jul 11; **9** (8):590-603. doi: 10.1038/nrmicro2613.

Nanodrop Technologies (2007). [en línea] Technical Support Bulletin. Wilmington, Delaware USA.

Ponting CP **(1997)**. Evidence for PDZ domains in bacteria, yeast, and plants. *Protein Sci Publ Protein Soc.* Feb; 6**(2)**:464-8.

QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit Instruction Manual Catalog #200523 (10 reactions). Agilent Technologies.

Romero- Calvo, Borja- Ocón, Martínez- Moya, Dolores- Suárez. **(2010)**. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Analytical Biochemistry*. doi: 10.1016/j.ab.2010.02.036.

Salomon R and Webster RG. **(2009)**. The influenza virus enigma. *Cell*. **136**: 402-410.

Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson **(1977)** DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* **74**(12): 5463-5467.

Sevilla-Reyes, Chavaro-Pérez, Piten-Isidro, Gutiérrez-González, Santos-Mendoza **(2013)**. Protein Clustering and RNA Phylogenetic Reconstruction of the Influenza a Virus NS1 Protein Allow an Update in Classification and Identification of Motif Conservation. *PLoS ONE* **8**(5): e63098. doi: 10.1371/journal.pone.0063098.

Sheng M, Sala C. **(2001)**. PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annu Rev Neurosci.* 2001; **24**: 1-29.

Smith W, Andrewes CH, Laidlaw PP. **(1993)**. A virus obtained from influenza patients. *The Lancet*. DOI: 10.1016/S0140-6736(00)78541.

Tonikian R, Zhang Y, Sazinsky SL, Currell B, Yeh JH, Reva B, Held HA, Appleton BA, Evangelista M, Wu Y, Xin X, Chan AC, Seshagiri S, Lasky LA, Sander C, Boone C, Bader G and Sidhu SS **(2008)**. A specificity map for the PDZ domain family. *PLOS Biol.* **6**(9): e239.

Wise Helen, Foeglein Agnes, Sun Jiechao, Dalton Rosa Maria **(2009)**. A Complicated Message: Identification of a Novel PB1-Related Protein Translated from Influenza A Virus Segment 2 mRNA. *Journal of Virology*, p. 8021–8031 Vol. **83**, doi: 10.1128/JVI.00826-09.

Wright PF, Neumann G, Kawaoka Y. **(2007)** "Orthomyxoviridae", en: Knipe D, Howley PM (eds.) *Fields Virology*, Vol II, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, USA: 1692-1731.

Yu J, Li X, Wang Y, Li B, Li H, et al. **(2011)** PDIIM2 Selectively Interacts with the PDZ Binding Motif of Highly Pathogenic Avian H5N1 Influenza A Virus NS1. *PLoS ONE* **6**(5): e19511. doi: 10.1371/journal.pone.0019511.

Zell Roland, Krumbholz Andi, Eitner Annett, Krieg Reimar **(2007)**. Prevalence of PB1-F2 of influenza A viruses. *Journal of General Virology*, **88**, 536–546 DOI 10.1099/vir.0.82378-0.

Zhenyi Zhang, Hua Li, Leyi Chen, Xingyu Lu, Jian Zhang, Ping Xu, Kui Lin. **(2011)**. Molecular Basis for the Recognition of Adenomatous Polyposis Coli by the Discs Large 1 Protein. *PLoS One*. **6**(8):e23507.

Apéndice

- Composición de amortiguadores

Solución amortiguadora de corrida	1X	10X
	Tris base 3.0 g	30 g
	Glicina 1.44 g	14.4 g
	SDS 1.0 g	10 g
	Agua desionizada 1L	1L
	Ajustar el pH a 8.3	

Solución amortiguadora de transferencia	1X	10X
	Tris base 3.0 g	30 g
	Glicina 14.4 g	144 g
	Metanol 20 %	20 %
	SDS 1.0 g	10 g
	Agua desionizada 1L	1 L
	Ajustar el pH a 8.3	

TBS	10 X	1 X
	Tris base 2.423 g	0.2423 g
	NaCl 29.22 g	2.922 g
	Agua desionizada 1L	1 L
	Ajustar el pH a 7.4	

TBS- T	10 X	1 X
	Tris base 2.423 g	0.2423 g
	NaCl 29.22 g	2.922 g
	Agua desionizada 1L	1 L
	0.1 % Tween 20	0.1 % Tween 20
	Ajustar pH a 7.4	

PBS	10 X	1 X
	NaCl 8.0 g	NaCl .800 g
	KCl 0.20 g	KCl 0.020 g
	Na ₂ HPO ₄ 1.44 g	Na ₂ HPO ₄ 0.144 g
	KH ₂ PO ₄ 0.24 g	KH ₂ PO ₄ 0.024 g
	Agua desionizada 1L	Agua desionizada 1L
	Ajustar el pH a 7.4	Ajustar el pH a 7.4