



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

**CLONACION, EXPRESION Y PURIFICACION DE LA PROTEASA
3C DEL VIRUS NORWALK Y DETERMINACION DE SU
ACTIVIDAD PROTEOLITICA.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

PRESENTA:

MARIA DEL PILAR GARCIA VALENCIA

ASESORES:

M. en C. ANA LAURA VAZQUEZ MARTINEZ

Dra. ANA LORENA GUTIERREZ ESCOLANO

M. en C. CARLOS SANDOVAL JAIME



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
SUPERIORES CUAUTITLAN
ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis:

"Clonación, expresión y purificación de la proteasa 3C
del virus Norwalk y determinación de su actividad
proteolítica"

que presenta la pasante: María del Pilar García Valencia
con número de cuenta: 403014514 para obtener el título de:
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 26 de mayo de 2008

PRESIDENTE

Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira

VOCAL

MC. Ana Laura Vázquez Martínez

SECRETARIO

MC. Oscar Zuñiga Lemus

PRIMER SUPLENTE

QFB. Jonathan Pablo Paredes Juárez

SEGUNDO SUPLENTE

MC. Maritza Domínguez Rojas

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio No. 9 de Virología del Departamento de Patología Experimental del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) bajo la tutoría de la Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la oportunidad de participar en esta maravillosa aventura llamada vida.

A mi mamá Pilar Valencia por tu amor, tus consejos, por ser mi mejor ejemplo, por tus ánimos, por tus sabios regaños, por tu tiempo, por hacer que yo fuera lo que hoy soy, por enseñarme que la vida no es fácil, pero es hermosa, te dedico este pequeño triunfo porque es tuyo: felicidades mami.

A mi papá Edmundo García por tu amor, por darme tu apoyo de todo tipo para que yo pudiera realizarme como persona y por tu esfuerzo para que nunca me faltara nada.

A mi hermano Edmundo García Valencia por cuidarme siempre, darme tu apoyo de todo tipo, por orientarme, por hacerme reír, te quiero mucho y deseo que muy pronto tú también realices tus sueños, yo prometo estar ahí para aplaudir tu esfuerzo y festejar tus triunfos.

A mi tía Malena y mi tío José, gracias de corazón por regalarme muchas vacaciones con mis primos, no tengo con que pagarles; fueron únicas e irrepetibles. Gracias porque, aunque hoy estén un poco lejos, yo los siento cerca de mí. Tía: eres un gran ejemplo de fortaleza.

A mis padrinos: Rocío Valencia y Gabino Gómez, gracias por apoyar a mi familia en los momentos difíciles; sobretodo a mi mamá. Gracias por ser un gran ejemplo para mí.

A mi novio Oscar "Mogui" por todos los hermosos momentos que me has regalado, por todo el tiempo que nos he robado, gracias por confiar en mí, muchas veces más de lo que yo confiaba, gracias por ser el mejor compañero, pero sobre todo gracias por tu amor, eres increíble. Te amo.

A mi prima más pequeña: Ana Rocío Gómez, gracias por dejarme acercar a ti, por lo que me has enseñado. Espero que, como hasta hora, logres las metas que te has marcado te prometo estar ahí para festejarlo y darte un gran abrazo. Siempre recuerda que lo que hacemos nos debe de hacer felices, sino es tiempo perdido.

A todos mis primos, tías y tíos, gracias simplemente por ser mi familia.

A mis amigos de la generación 30: Fabiola, Mireya, Jorge (coker), Miguel Ángel, a la "manada" Daniela, Alex GG, Alex Franchini, Lety, Angélica, Carmen, Dalila, Hector Marduck, Claudia, Itzmel gracias por dejarme conocerlos y compartir con ustedes esta etapa, por los días interminables en los que estudiábamos, pero al mismo tiempo nos divertíamos, esos son los recuerdos que me llevo de ustedes, les deseo todo el éxito.

A mi Alma Mater: UNAM-FES Cuautitlán por darme el privilegio de formarme en sus aulas y de poder decir con orgullo: soy universitaria.

A todos mis profesores de la carrera, por realizar la tarea más bonita de todas: enseñar a alguien que es capaz de superarse en todos los aspectos. De todos y cada uno me llevo lo mejor; sus lecciones y sus consejos. De corazón: GRACIAS.

A la Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano por haberme recibido en su laboratorio y darme la oportunidad de conocerla, por ser una excelente investigadora y siempre estar dispuesta a regalarme sus conocimientos, por hacerme parte de su equipo en el laboratorio.

Al M. en C. Carlos Sandoval, gracias por tu tiempo, tus conocimientos, tu disponibilidad para enseñarme, por hacer tan divertido el trabajo y sobre todo gracias por tu amistad.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| 1.- Introducción | 1 |
| 1.1 Gastroenteritis..... | 1 |
| 1.2 Historia del virus Norwalk..... | 2 |
| 1.3 Descubrimiento del virus Norwalk..... | 3 |
| a) Clasificación..... | 4 |
| b) Manifestaciones clínicas..... | 5 |
| c) Diagnóstico..... | 6 |
| c.1) Microscopía electrónica..... | 7 |
| c.2) Transcripción Reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)..... | 7 |
| c.3) Inmunoensayos..... | 7 |
| 1.4 Inmunidad a norovirus..... | 8 |
| 1.5 Vacuna contra el virus Norwalk..... | 8 |
| 1.6 Medidas de prevención..... | 10 |
| 1.7 Tratamiento..... | 11 |
| 1.8 Biología Molecular..... | 12 |
| a) Morfología y organización genómica..... | 12 |
| b) Ciclo de replicación..... | 13 |
| b.1) Traducción..... | 14 |
| b.1.1) Procesamiento proteolítico | 15 |
| b.1.1.1) VP1 y VP2..... | 16 |
| b.1.1.2) p48..... | 17 |
| b.1.1.3) NTPasa..... | 17 |
| b.1.1.4) p22..... | 17 |
| b.1.1.5) VPg..... | 17 |
| b.1.1.6) RdRp..... | 18 |
| b.1.1.7) 3CLpro..... | 18 |
| b.2)Replicación..... | 19 |
| 1.9 Proteasas..... | 21 |
| a) Definición y tipos..... | 21 |
| b) Proteinasas virales..... | 23 |
| 1.10 Proteína La..... | 25 |

| | |
|---------------------------------|----|
| 2.- Justificación..... | 28 |
| 3.- Hipótesis..... | 28 |
| 4.- Objetivo general..... | 29 |
| 4.1 Objetivos particulares..... | 29 |
| 5.- Metodología..... | 30 |
| 6.- Resultados..... | 44 |
| 7.- Discusión..... | 59 |
| 8.- Conclusiones..... | 64 |
| 9.- Anexo..... | 65 |
| 10.- Referencias..... | 69 |

i) LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figura No. 1 Análisis filogenético de la familia *Caliciviridae*.

Figura No. 2 Microscopía electrónica del virus Norwalk.

Figura No. 3 Organización genómica de NV.

Figura No. 4 Ciclo de replicación de los Norovirus.

Figura No. 5. Características generales de los virus que contienen genomas de RNA que utilizan una transcripción del RNA dirigida por RNA.

Figura No. 6 Representación esquemática de una proteinasa y su sustrato.

Figura No. 7 Amplificación por PCR del gen 3C del virus Norwalk.

Figura No. 8 Mapa del vector pJET1/blunt™.

Figura No. 9 Purificación de clonas candidatas del plásmido pJET1/blunt™ + 3C.

Figura No. 10 Restricción del plásmido pJET1/blunt™ + 3C.

Figura No. 11 Purificación del gen que codifica para la proteína 3C del virus Norwalk.

Figura No. 12 Purificación del vector pPROEX™ HTb y restricción con la enzima XhoI.

Figura No. 13 PCR colony de bacterias DH5α transformadas con el plásmido PC3C.

Figura No. 14 Mapa de restricción enzimática del vector de clonación pPROEX™ HTb.

Figura No. 15 Análisis teórico del plásmido candidato cortado con la enzima EcoRI.

Figura No. 16 Análisis de restricción con la enzima EcoRI para determinar el sentido del inserto 3C.

Figura No. 17 Inducción y purificación de la proteasa 3C del virus Norwalk.

Figura No. 18 Ensayo de Western blot de la proteína rLa procesada con r3C.

Figura No. 19 Ensayo de corte sobre la proteína rGST.

Figura No. 20 Gráfica que representa la tendencia de los valores obtenidos de las distancias entre los marcadores de PM BenchMark™ Pre-stained Ladder.

Figura No. 21 Gráfica que representa la tendencia de los valores obtenidos de las distancias entre los marcadores de PM BIORAD™.

Tabla No. 1 Relación de las distancias y los PM con marcadores BenchMark™ Pre-stained Ladder.

Tabla No. 2. Relación de las distancias y los PM con marcadores BIORAD™.

Tabla No. 3 Peso molecular calculado de la proteína rLa procesada por la proteasa r3C del virus Norwalk.

ii) TABLA DE ABREVIATURAS

| Abreviatura | Significado |
|--------------------|---|
| NV | Virus Norwalk |
| HuCVs | Calicivirus Humanos |
| ORF | Marco de lectura abierto |
| VLPs | Partículas de tipo viral |
| Rnv | Partículas recombinantes del Virus Norwalk |
| aa | Aminoácidos |
| bp | Pares de Bases |
| kDa | Kilodaltons |
| °C | Grados Celsius |
| mL | Mililitros |
| μL | Microlitros |
| mg | Miligramos |
| μg | Microgramos |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| rLa | Proteína recombinante La |
| rGST | Proteína recombinante glutatión-S-transferasa |
| r3C | Proteína recombinante 3C |
| PV | Virus de la polio |
| cDNA | DNA copia |
| PM | Peso molecular |
| RPBI | Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos |
| IPTG | Isopropil-β-D-tio-galactósido |
| D.O. | Densidad óptica |

iii) RESUMEN

La gastroenteritis representa un problema de morbilidad y mortalidad en los países desarrollados y en los que están en desarrollo; pero es en éstos últimos donde tiene un mayor impacto ya que es una causa muy importante de muerte principalmente en niños menores de 5 años.

Aunque inicialmente el virus Norwalk (prototipo de los norovirus) fue identificado en la ciudad de Norwalk, Ohio, Estados Unidos de América, hoy en día se sabe que estos virus causan brotes de gastroenteritis en todo el mundo. Un ejemplo de ello es el brote de gastroenteritis aguda ocurrido en el sur de la Ciudad de México en julio de 2007 (sólo por citar el caso más reciente), en el cual 10,600 personas resultaron afectadas, debido a la contaminación del agua potable por aguas negras. Hasta ahora, el 98% de las muestras que han sido estudiadas resultaron positivas a norovirus.

El NV pertenece a la familia *Caliciviridae*, al género *Norovirus*; éstos son reconocidos como la principal causa de brotes de gastroenteritis no bacteriana a nivel mundial. Desafortunadamente el estudio de la biología de los norovirus que afectan a los humanos ha sido complicado porque hasta la fecha no existe una línea celular permisible a la infección en la cual se puedan estudiar los eventos de replicación y traducción viral, así como tampoco está disponible un modelo animal para simular una infección *in vivo*. Para subsanar esta carencia se ha hecho uso de la Biología Molecular, con lo cual se ha podido estudiar la expresión genética y dilucidar la función de sus proteínas.

En este trabajo se presenta la clonación, expresión, purificación así como la determinación de la actividad proteolítica de la proteasa recombinante 3C del NV sobre la proteína celular recombinante La.

Inicialmente se amplificó el gen que codifica para la proteasa 3C a partir del cDNA del NV por la técnica de PCR. Posteriormente se realizó su clonación en el vector pJET1/blunt™. Mediante un ensayo de restricción con la enzima XhoI se liberó la secuencia del gen de la 3C y se subclonó en el vector de expresión procarionte pPROEx™ HTb. De las clonas positivas a la presencia del gen 3C, se aisló el plásmido llamado PC3C, este se secuenció corroborándose la presencia del gen de la proteasa 3C. A partir de ellos se expresó la proteína 3C y esta se purificó parcialmente.

Contando ya con la proteína r3C parcialmente purificada se realizaron ensayos de actividad de proteasa sobre la proteína rLa, en los cuales se determinó que esta proteína es procesada por la proteasa 3C. El sitio de corte se identificó entre los aminoácidos 358 y 359 que corresponden a glutamina-glicina respectivamente; la porción de proteína que procesa la r3C está en el extremo carboxilo terminal, donde se encuentra la señal de localización nuclear de La. El resultado obtenido de este procesamiento concuerda con lo reportado para el caso del virus de la polio, ya que la 3C de éste procesa a la proteína La, tanto a la recombinante como a la nativa en células HeLa.

1.- INTRODUCCIÓN

1.1 GASTROENTERITIS

La gastroenteritis representa un problema de salud pública a nivel mundial, especialmente entre los niños y adultos mayores. Anualmente se estima que ocurren más de 700 millones de casos de gastroenteritis aguda solo en niños menores de 5 años. Ésta enfermedad es una causa importante de morbilidad y mortalidad; la mortalidad asociada con esta enfermedad se estima entre 3.5 y 5 millones por año, cuya mayor proporción de muertes ocurre en países en desarrollo (1,4).

La gastroenteritis se define como una inflamación del estómago y/o disfunción del intestino producida por un microorganismo o sus toxinas, que se manifiesta por diarrea (tres o más deposiciones diarias o, al menos 200 g de heces al día) acompañada o no de vómitos y dolor abdominal (18).

La gastroenteritis aguda es causada por diferentes patógenos (4). Por ejemplo bacterias del tipo *Salmonella* spp, *Shigella* spp. y *Yersinia* spp. entre otras; por parásitos como *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Isospora belli* y por virus como rotavirus, adenovirus y astrovirus, los cuales se han establecido como agentes etiológicos importantes de gastroenteritis en niños (1).

Recientemente los norovirus (anteriormente llamados Norwalk like particles o “virus tipo Norwalk”), pertenecientes a la familia *Caliciviridae*, han sido identificados como la causa más común de brotes de gastroenteritis no bacterianos a nivel mundial en individuos de todas las edades (2). Los calicivirus humanos (HuCVs), constituidos por los norovirus y los miembros del género Sapovirus que infectan a humanos, se transmiten principalmente por la ruta fecal-oral, por el contacto persona a persona y por la ingesta de alimentos contaminados crudos o poco cocidos, principalmente mariscos y ensaladas (3).

El curso de la enfermedad es usualmente leve y autolimitante, pero el virus es altamente infeccioso y los brotes de gastroenteritis pueden involucrar a pequeños grupos familiares o a cientos de individuos. Muchos estudios han demostrado que los HuCVs ocupan el segundo lugar, después de rotavirus, como el agente causal de gastroenteritis viral en niños pequeños (2).

Las manifestaciones clínicas más importantes de la gastroenteritis incluyen una diarrea leve, pero en algunos casos los síntomas pueden presentarse más severos, desde náuseas y vómito hasta una diarrea que lleva a la deshidratación e incluso hasta la muerte (4).

Los norovirus están clasificados como agentes biológicos de clase B debido a su alta capacidad de infectar, estabilidad, a sus brotes imprevistos y a lo debilitante de la enfermedad que provocan. A pesar del impacto económico tan significativo y a la considerable morbilidad causada por los norovirus, actualmente no hay medicamento o una vacuna disponible para controlar o prevenir la enfermedad. Así mismo muchos aspectos de su biología no se conocen por completo, debido en parte a la ausencia de un sistema de cultivo celular o de un modelo animal para su propagación (20).

1.2 HISTORIA DEL VIRUS NORWALK

Los descubrimientos bacteriológicos y parasitológicos realizados durante el siglo XX identificaron la etiología de sólo una pequeña proporción de las diarreas dejando una gran parte de casos sin el establecimiento formal del agente etiológico.

Durante los años 1940 y 1950 se asumió por exclusión que los virus eran los responsables de la mayor proporción de estas enfermedades de causa desconocida. Debido a que los presuntos agentes etiológicos virales no se podían cultivar y propagar *in vitro* se llevaron a cabo estudios con individuos voluntarios en Estados Unidos y Japón. Estos estudios mostraron que los filtrados de las heces de los pacientes que

habían enfermado en los brotes de gastroenteritis eran capaces de reproducir la enfermedad; demostrando que los virus eran la causa más probable.

Una segunda generación de estudios en humanos voluntarios se inició en los años 1970's, en el que las muestras recolectadas durante un brote de gastroenteritis en Norwalk, Ohio demostraron ser importantes en el establecimiento de la infección (17).

El brote en la ciudad de Norwalk comenzó en octubre de 1968 y fue investigado por el Centro de Control de Enfermedades (CDC) reportando que durante un período de 2 días el 50% de un total de 232 estudiantes y maestros de una escuela primaria desarrollaron una gastroenteritis aguda, y un segundo brote incluyó al 32% de los familiares, los cuales estuvieron en contacto con los individuos enfermos. La enfermedad duró aproximadamente 24 horas, con un período de incubación de cerca de 48 horas, y le dieron el nombre de “enfermedad del vómito de invierno”. Aunque algunos de los pacientes tuvieron diarrea, las principales manifestaciones clínicas fueron vómito y náusea (30).

Posteriormente se realizaron estudios intensivos de las muestras clínicas del brote en Norwalk, lo cual llevó a revelar al agente etiológico (1).

1.3 DESCUBRIMIENTO DEL VIRUS NORWALK

En 1972 Kapikian y colaboradores utilizaron la técnica de inmunomicroscopía electrónica (IEM) para identificar partículas de 27nm de diámetro, en un filtrado fecal utilizado para inducir la enfermedad en humanos. Estas partículas se precipitaron en una reacción antígeno-anticuerpo utilizando suero de la fase convaleciente de un paciente que contrajo la enfermedad seguido de la inoculación con un filtrado fecal (8).

Posteriormente el ensayo fue modificado para cuantificar los anticuerpos presentes en suero y demostraron que había significativamente más anticuerpos en el suero de la fase convaleciente que en el de la fase aguda. Con los datos anteriores, el

virus Norwalk fue propuesto como el agente etiológico del brote de gastroenteritis en Norwalk, Ohio (8).

a) Clasificación

El virus Norwalk pertenece a la familia *Caliciviridae*, la cual está compuesta de cuatro géneros: *Vesivirus*, que incluye al calicivirus felino FCV, *Lagovirus*, dentro del cual se encuentra el virus de la enfermedad hemorrágica de los conejos, *Norovirus*, en la cual se clasifica el virus Norwalk como prototipo del género y a varios virus relacionados que han sido aislados de diferentes partes del mundo, incluyendo al MD145-12 y *Sapovirus*, donde se localiza el virus Sapporo y el calicivirus entérico porcino (2).

Los norovirus se subdividen en 5 genogrupos (Figura No. 1): GI, GII GIII, GIV y GV. Es importante mencionar que en el genogrupo V se encuentra el norovirus murino (MNV), descrito por primera vez en 2003, y el cual es el único norovirus que se replica en cultivo celular y en un modelo animal: el ratón. Aunque el modelo de MNV no podrá usarse para estudiar la patogenia de la enfermedad en humanos, es actualmente el mejor modelo de estudio de la biología molecular de los norovirus (20).

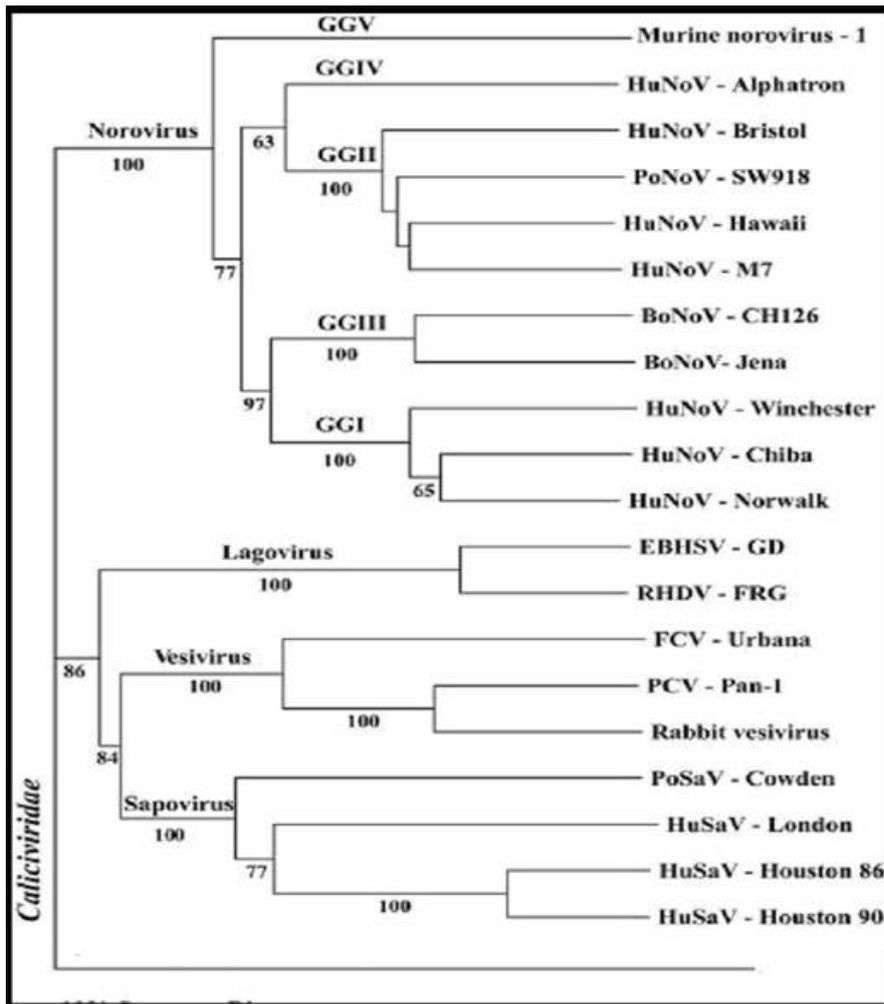


Figura No. 1: Análisis filogenético de la familia *Caliciviridae*. Tomada de Wobus, C. 2006.

b) Manifestaciones clínicas

El virus Norwalk produce una gastroenteritis poco severa y autolimitante, aunque puede ser incapacitante durante la fase sintomática, la cual dura de 24 a 48 horas (17).

Algunos conocimientos sobre la patogénesis y la inmunidad de las infecciones causadas por NV y NLVs han sido obtenidos de los estudios en voluntarios, los cuales han revelado en algunas ocasiones lesiones histopatológicas transitorias en la mucosa de la parte alta del intestino delgado incluyendo ensanchamiento y acortamiento de las microvellosidades. En personas infectadas se observa una infiltración de células

mononucleares de la lámina propia y una vacuolización citoplásmica; las mucosas rectales y gástricas no se ven afectadas histológicamente (8).

El sitio de replicación del virus aún no se ha detectado con precisión; sin embargo éste es expulsado en las heces fecales y también se ha detectado en el vómito(8).

La expulsión viral generalmente tiene su pico en el día 1 ó 2 después de la infección, pero puede continuar hasta más de 2 semanas después de la ausencia de síntomas clínicos. Es importante mencionar que el virus también es expulsado por individuos con infecciones subclínicas (8). Se ha comprobado una alta proporción de infecciones asintomáticas. Este hecho está apoyado por estudios de seroprevalencia que muestran que prácticamente todos los niños son seropositivos a la edad de 5 años (19).

Las manifestaciones clínicas características de una infección por norovirus humano son: vómito explosivo, diarrea acuosa, fiebre de bajo grado, malestar, náuseas, dolor de cabeza, mialgias, dolor o incomodidad abdominal (20).

c) Diagnóstico

Entre 1970 y 1980 se llevó a cabo la primera generación de pruebas de diagnóstico utilizando reactivos humanos, obtenidos de individuos previamente infectados. Lo anterior se debió a que el número de partículas virales en las deposiciones de las personas infectadas se encontraban en poca cantidad y a la incapacidad para propagar a NV y a virus relacionados en un cultivo celular; esto influyó en el hecho de que no se pudiera producir suero hiperinmune en animales.

Por lo anterior las deposiciones de individuos infectados de manera aguda sirvieron como una fuente de antígenos virales, y los sueros de la fase convaleciente de individuos infectados fueron utilizados como sueros hiperinmunes. Estas restricciones limitaron la disponibilidad de las herramientas del diagnóstico a unos pocos

laboratorios. Sin embargo algunas pruebas se desarrollaron con estos reactivos y se utilizaron para empezar a establecer la epidemiología de NV y de otros calicivirus humanos (4).

c.1) Microscopía electrónica (EM): ésta técnica continúa siendo una herramienta importante para el diagnóstico de gastroenteritis virales debido a la rapidez de la prueba y a la mínima preparación requerida de la muestra. Sin embargo el método requiere de microscopistas altamente calificados y un equipo costoso; limitando su uso en estudios clínicos o epidemiológicos (4).

Además, el tiempo de recolección es crítico para tener éxito en la detección del virus. Por ejemplo, se ha reportado la detección de norovirus en 26 de las 54 muestras colectadas en las primeras 72 horas del comienzo de la enfermedad, pero sólo en 2 de 11 muestras colectadas en tiempos posteriores (17).

c.2) Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR): ésta técnica es la más ampliamente utilizada para la detección de los HuCVs. Se han descrito muchos oligonucleótidos para la amplificación de regiones conservadas del genoma de RNA, las más comunes son la de la polimerasa y la cápside. Con este método los calicivirus pueden detectarse en muestras clínicas (heces o vómito), alimento contaminado, agua o fomites (17).

c.3) Inmunoensayos: el desarrollo de rVLPs (del inglés recombinant virus like particles) ha tenido un gran impacto en el desarrollo de pruebas de diagnóstico basadas en la reacción antígeno-anticuerpo. Las rVLPs se forman a partir de los genes codificantes para la cápside de NV (ORF2) y el producto terminal ORF3; cuando son transferidos a células de insectos, ya que aquí las proteínas de la cápside (VP1 y VP2) se autoensamblan formando las rVLPs; estas partículas tienen una morfología similar al NV nativo pero sin el genoma de RNA.

Las pruebas de ELISA que utilizan rVLPs como antígenos son específicas, sensibles y eficientes para la detección de la infección de los HuCVs, dichas rVLPs se han utilizado en muchos estudios sero-epidemiológicos (17), sin embargo su alta especificidad no ha permitido su uso con más frecuencia.

1.4) INMUNIDAD A NOROVIRUS

Los estudios en voluntarios indican que la inmunidad a los norovirus es por un periodo corto y además no provee buena protección en una infección con otras cepas heterólogas. Observaciones hechas en adultos con infecciones repetitivas sugieren que la inmunidad a largo plazo es inexistente (10).

Estudios recientes indican que la susceptibilidad a una infección por los norovirus esta asociada con el tipo de sangre ABH, así como a los carbohidratos expresados en el intestino y a la preferencia de cada cepa (10).

1.5) VACUNA CONTRA EL VIRUS NORWALK

La vacunación contra los agentes microbianos es lo mejor en la relación costo-efectividad para reducir la morbilidad y mortalidad en una población. La razón para desarrollar una vacuna generalmente se hace con base en su significancia clínica (incidencia de morbilidad y mortalidad) de una enfermedad viral específica en la población general o en una población específica. Como ya se ha mencionado, la epidemiología, historia natural y la significancia clínica de las infecciones por HuCVs están cambiando rápidamente, en parte debido a nuevas pruebas de detección más eficientes. Además de que la incidencia extendida e importancia clínica de NV y otras infecciones con los HuCVs hoy en día son mucho más aparentes (8).

Los retos a superar para el desarrollo de una vacuna contra los HuCVs son:

- 1) La correlación de la protección inmune, la cual no está claramente definida.
- 2) La existencia de muchos tipos de HuCVs.
- 3) Los datos limitados de retos de cruzamientos indican que la infección con algunos tipos de HuCVs no provee protección contra infecciones subsecuentes por otro tipo de HuCVs.
- 4) La inmunidad de la mucosa puede ser necesaria, pero nuestro conocimiento es limitado sobre como sacar provecho exitosamente de esta inmunidad.
- 5) El virus no puede cultivarse de manera conveniente.
- 6) No existe un modelo animal simple (8).

Las propiedades de una vacuna candidata son las siguientes: las partículas recombinantes de NV (rNV) o VLPs son morfológica y antigénicamente similares a las partículas nativas. Se ha visto que las VLPs también son altamente inmunogénicas cuando se inoculan parenteralmente a animales de experimentación. Las partículas rNV presentan 4 propiedades únicas que pueden ser ventajosas para un inmunógeno eficaz en la mucosa: 1) La cápside de NV contiene 180 copias de una proteína de 60 kDa, 2) Las VLPs de NV son estables a pH bajos (como lo es el pH del estómago), 3) Las VLPs de NV pueden ser liofilizadas y reconstituidas en agua o en buffer y 4) Las VLPs de rNV son particuladas y además pueden tener como blanco las placas de Peyer en el tracto gastrointestinal. Estos inmunógenos sin capacidad de replicarse representan un candidato para el desarrollo de una vacuna humana (8).

En la fase I de los estudios las rVLPs como vacunas demostraron ser seguras e inmunogénicas cuando se administraron a adultos voluntarios por vía oral. Si los mecanismos de la inmunidad son elucidados y se encuentra que los anticuerpos juegan un papel importante en la prevención, las rVLPs pueden probar ser una vacuna

potencial (17).

Una vacuna segura y efectiva puede reducir la incidencia de las epidemias de gastroenteritis virales; esta vacuna, si es factible, puede ser de especial importancia en lugares como colegios, personal militar, casas de reposo, y para otros lugares institucionales; además se puede reducir el número de episodios de gastroenteritis en bebés y niños, especialmente en los que viven en países en desarrollo (17).

1.6 MEDIDAS DE PREVENCIÓN

No existen métodos específicos disponibles para la prevención o el control de una infección por una infección por HuCVs o la enfermedad que ellos provocan. Debido a que estos virus son altamente infecciosos, un lavado efectivo de las manos, la eliminación o desinfección de material contaminado puede disminuir la transmisión dentro de una familia o institución (17).

Se debe de tener un cuidado especial en el manejo de la comida en vista de los brotes reportados a causa del consumo de alimento contaminado. Las mediciones que incrementen la pureza del agua potable para beber o del agua de las albercas pueden disminuir la frecuencia de los brotes (3).

Como ya se mencionó los norovirus son los principales agentes causales de las epidemias de gastroenteritis (el más común de éstos es el norovirus 611.4), y el agua es una ruta importante en su transmisión. Se sospecha que estos virus también son agentes importantes en gastroenteritis endémicas provocadas por la contaminación del agua potable con residuos fecales (11).

Existen reportes donde se sugiere que el NV es muy resistente a la desinfección clorada, ya que experimentalmente una suspensión de virus en agua conservó su infectividad después de la administración de 3.75 mg de cloro /litro de agua y un tiempo de exposición de 30 minutos (11).

La resistencia de NV a la cloración implica un alto riesgo para la población consumidora de agua clorada si se consideran su alta infectividad (bajas dosis para ser infeccioso) y su amplia distribución en la población (11). Es por lo anterior que el ozono es una muy buena opción para desinfectar el agua, dado su fuerte poder oxidante y su capacidad desinfectante contra la mayoría de los patógenos del agua. De hecho, la mayoría de los virus entéricos estudiados como rotavirus, parvovirus y el virus de hepatitis A son inactivados sustancialmente por el ozono (11).

Para el NV se tiene reportado una dosis de ozono a la cual es sensible: 0.37 mg/litro a pH de 7, a 5°C, con 5 minutos de exposición. El mecanismo de la inactivación del virus es la degradación oxidativa que ocurre bajo las condiciones mencionadas; tal vez los ácidos nucleicos del virus son el primer blanco del ozono (11).

1.7 TRATAMIENTO

Como ya se mencionó anteriormente, los norovirus inducen una gastroenteritis leve y auto limitante que normalmente se resuelve sin complicaciones. El reemplazo de electrolitos y fluidos orales es usualmente suficiente para compensar la pérdida de los fluidos. De cualquier modo, la administración parenteral de los fluidos puede ser necesaria en el caso que exista vómito o diarrea severa; la hospitalización por una severa deshidratación, aunque rara, puede ocurrir con una gastroenteritis ocasionada por NV. Se han reportado muertes por esta causa en pacientes de edad avanzada y en niños, así como en personas inmunocomprometidas (17).

La administración oral de subsalicilato de bismuto una vez iniciados los síntomas reduce severamente la duración de los dolores abdominales (17).

1.8 BIOLOGÍA MOLECULAR

a) Morfología y organización genómica

El virus Norwalk es el prototipo de los calicivirus humanos. Por medio de una tinción negativa con microscopía electrónica se determinó que el virus tiene una apariencia amorfa con un borde externo plumoso (5). Poseen 32 depresiones con forma de copa en su superficie distribuidas simétricamente para constituir un icosaedro. En una orientación, estas depresiones le dan al virus un aspecto característico de “estrella de David” (Figura No. 2) (19).

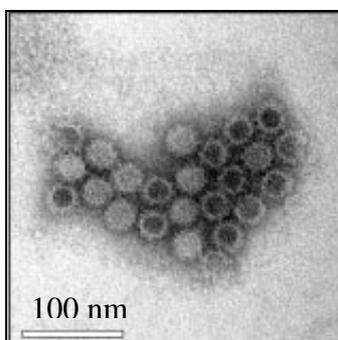


Figura No. 2: Microscopía electrónica del virus Norwalk. Tomada de Guix, S. 2007.

El NV es pequeño (de 27 a 35 nm de diámetro), redondo, no envuelto, por lo que se denominan SRSV. El virión contiene como genoma RNA de cadena sencilla de polaridad positiva (+) de 7.7 kb, este RNA se encuentra poliadenilado del extremo 3' y unido de manera covalente a una proteína viral llamada VPg en el extremo 5'.

El genoma se encuentra organizado en 3 marcos de lectura abiertos (ORF) (3). El ORF1 codifica para una poliproteína de 200 kDa que da origen a las proteínas no estructurales; el ORF2 codifica para la proteína mayoritaria de la cápside de 60 kDa llamada VP1, y el ORF3 codifica para una proteína básica estructural minoritaria de la cápside llamada VP2 (4). La poliproteína originada del ORF1 es procesada por la proteinasa viral “3C-like” para originar a los precursores o péptidos que constituyen a las proteínas no estructurales, las cuáles son requeridas para la replicación del virus.

Esta poliproteína se divide en 6 dominios funcionales, los cuales se han designado como proteína p48, nucleósido trifosfatasa 2C-like (NTPase), p20 o p22 (dependiendo del genogrupo), proteína viral unida al genoma (VPg), proteinasa (Pro o 3C) y polimerasa (Pol o 3D) (4).

Para los norovirus se ha propuesto que la cápside (codificada por ORF2) y la proteína básica (ORF3) son expresadas a partir de un RNA subgenómico (Figura No.3). La presencia de éste durante la replicación sugiere que los norovirus regulan la síntesis de las proteínas estructurales utilizando un mensaje subgenómico que se encuentra de manera abundante (20).

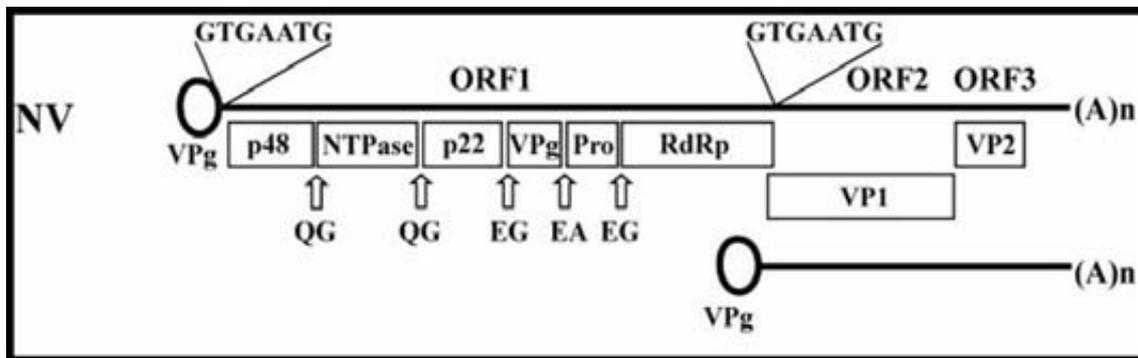


Figura No. 3. Organización genómica de NV. Los sitios de corte están indicados con flechas así como los aminoácidos que rodean a este sitio. El RNA subgenómico se muestra por debajo del RNA genómico. Se predice la presencia de una proteína viral unida tanto al RNA genómico como al subgenómico (VPg). Tomada de Wobus, C. 2006.

b) Ciclo de replicación

Debido a que los virus contienen una limitada información genética ellos dependen de la maquinaria celular para su replicación (22). Por lo tanto, la mayoría de los eventos en una infección viral involucran interacciones entre los componentes virales (relativamente pocos) con los de su hospedero (generalmente muchos y de mayor complejidad); este mar de factores del hospedero representa tanto al medio esencial en el cual los virus deben adaptarse para sobrevivir como una fuente enorme y manipulable de recursos para los virus con pocos genes. De acuerdo a esto, los factores

del hospedero juegan roles importantes en la mayoría de los eventos en la infección viral (23).

Los factores del hospedero participan en todos los eventos de la infección de los virus de RNA (+), incluyendo la entrada, la expresión de genes virales, la replicación del RNA, el ensamblaje y liberación del virión; estos factores son regulados por los virus para modular la expresión de genes del hospedero y sus defensas (23).

b.1) Traducción

El conocimiento de la estructura del genoma es solo el primer paso para entender la replicación del virus; la carencia de un sistema de cultivo celular ha impedido de gran manera el progreso en el entendimiento de la expresión de genes y la regulación de calicivirus entéricos de humanos. Por lo tanto, los estudios de la expresión genética de los virus humanos tienen que hacer uso de sistemas de expresión heterólogos y de traducciones *in vitro* (5).

Como la mayoría de los genomas de los virus de RNA de polaridad positiva, el genoma de NV opera como un molde que regula la síntesis de sus proteínas (traducción); así como del RNA, que funciona como genoma de la progenie viral (replicación). Ambos procesos requerirán interacciones entre los factores traduccionales del hospedero y la replicación del RNA en múltiples niveles (23).

El ciclo de replicación del virus Norwalk no se conoce totalmente, sin embargo por el hecho de ser un virus de cadena sencilla de RNA (+) su ciclo replicativo en general debe ser semejante. La replicación viral requiere de dos etapas (Figura No.4):

- 1.- Traducción de proteínas
- 2.- Replicación del RNA

Primero debido a que estos virus contienen RNA (+) éste es utilizado para la expresión de las proteínas virales, fenómeno conocido como traducción de proteínas virales (24).

La traducción del virus Norwalk está mediada por la presencia de una proteína viral, llamada VPg, que se encuentra unida covalentemente al extremo 5' del RNAm y que promueve la unión al ribosoma y la consecuente producción de la poliproteína, que es procesada por una proteinasa viral o por proteinasas del hospedero para dar origen a las proteínas no estructurales. Se sabe que muchas de estas proteinasas virales interactúan con proteínas celulares, particularmente con la maquinaria de traducción del hospedero y por lo tanto abarcan ambas funciones de procesamiento de poliproteínas ejerciendo un control en la traducción (25).

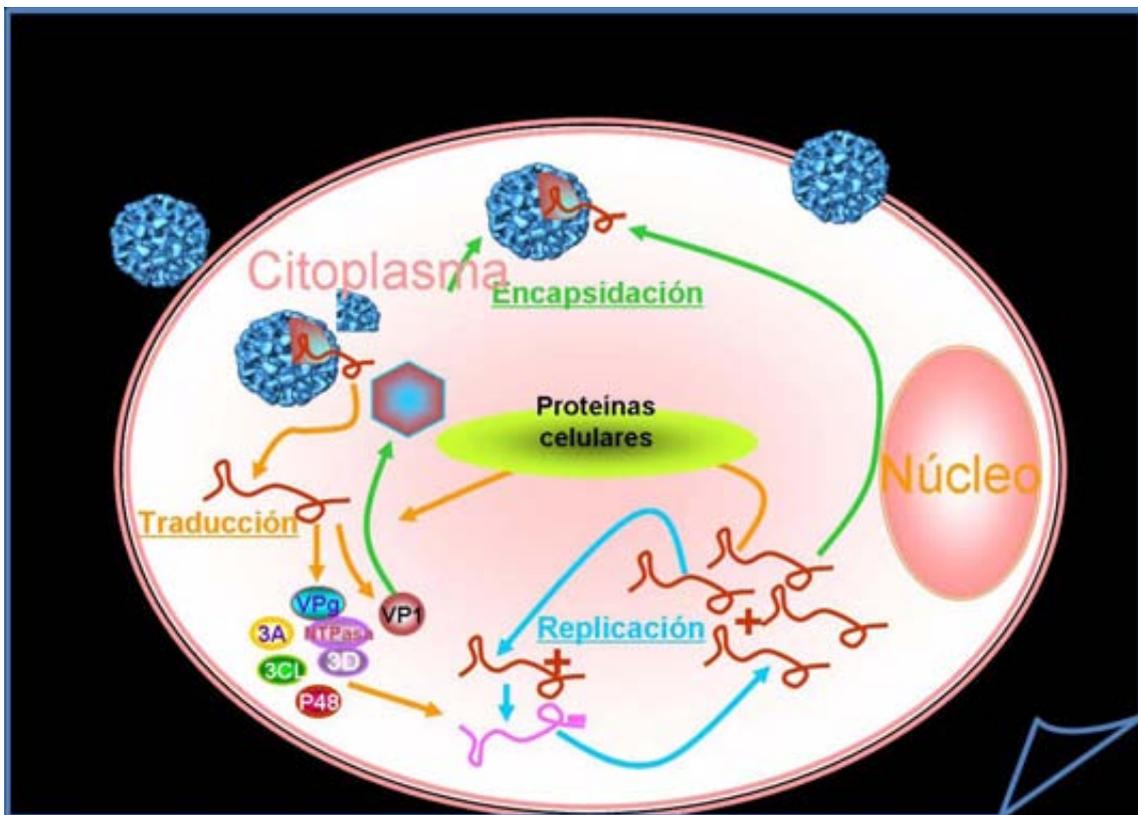


Figura No. 4: Ciclo de replicación de los Norovirus. El primer evento en el ciclo es el anclaje del virus con el receptor, posteriormente se pueden dar dos eventos simultáneos: la replicación del RNA viral y la síntesis de proteínas virales.

b.1.1) Procesamiento proteolítico

Debido a que NV posee un genoma pequeño, expresa precursores proteicos generados a partir del procesamiento incompleto de una poliproteína durante

la infección. Estos precursores son activos y pueden ser nuevamente procesados por proteasas celulares o virales en sitios específicos hasta dar origen a la proteína viral madura, la cual no puede continuar siendo procesada por carecer de estos sitios de corte. Es por ello que la replicación viral es regulada por un procesamiento proteolítico, de los precursores, que exhiben diferentes funciones a las de las proteínas maduras (7).

Las proteínas no estructurales de los calicivirus se producen por una proteólisis de una poliproteína precursora codificada por un solo ORF en la región 5' del genoma. En este caso la única proteasa viral, la 3C, es la encargada de llevar a cabo el procesamiento. Por otro lado, la proteína estructural de la cápside se traduce de un mRNA subgenómico que es homólogo con la región terminal 3' del genoma (5) y no es susceptible de proteólisis.

Dentro de estas proteínas estructurales se encuentran:

b.1.1.1) VP1 y VP2: las cuales forman al virión; este se compone de 90 dímeros de la proteína mayoritaria de la cápside (VP1) y de una o dos copias de la proteína minoritaria (VP2). La VP1 va aproximadamente del aminoácido 530 al 555 y tiene un peso molecular de 58-60 kDa. Tiene dos dominios conservados que flanquean a un dominio central variable, el cual parece contener determinantes antigénicos que definen la especificidad de la cepa. La VP1 se ensambla como VLP's cuando se expresa en células de insecto por medio de un baculovirus recombinante; éstas partículas son estructural y antigénicamente similares al virus nativo con la única excepción de que no contienen RNA. Estas VLP's se unen a una proteína celular de 105 kDa (6).

La VP2 va del aminoácido 208 al 268, tiene un peso molecular de 22-29 kDa y exhibe una secuencia extensa de variabilidad entre las cepas. Los roles de VP2 en el ciclo de replicación aún se desconocen. Se sabe que no es necesaria para el ensamblaje de las VLP's, pero es esencial para la producción de virus infecciosos (6). VP2 es una

proteína básica con un punto isoeléctrico calculado >10.0 y esto sugiere que ella une RNA. Adicionalmente a esta idea se cree que VP2 puede funcionar en el proceso de empaque del genoma de RNA (6).

b.1.1.2) p48: esta proteína se encuentra en el extremo N-terminal del ORF1; es algo variable en longitud y secuencia entre los genogrupos I y II de los calicivirus, la secuencia conservada se incrementa hacia el sentido carboxilo terminal de la proteína. Hasta la fecha no se ha encontrado ninguna secuencia similar significativa entre p48 y otras proteínas virales o celulares. Se cree que ella puede coordinar, con propiedades de localización, el anclaje o aseguramiento de los complejos de replicación y su unión a la membrana (6).

b.1.1.3) NTPasa: su función en la replicación aún no está bien determinada; aunque presenta un dominio en su estructura responsable de la unión al DNA, además es una proteína que hidroliza el ATP (adenosina trifosfato) (6).

b.1.1.4) p22: esta proteína ocupa una posición similar en el genoma de los norovirus a la proteína 3A de los picornavirus. No existen datos claros sobre su posible función, con la excepción de su presencia en el precursor p22-VPg-3CL^{pro} que sufre un procesamiento proteolítico. La proteína 3A de poliovirus es importante para la localización membranal de los complejos de replicación (6).

b.1.1.5) VPg: tiene un peso molecular de aproximadamente 15 kDa y está unida covalentemente al extremo 5' de los mRNAs genómico y subgenómico. Esta proteína juega funciones variables en los ciclos de replicación, algunas de las cuáles son comunes entre las familias *Picornaviridae*, *Potyviridae*, *Luteoviridae* y *Comoviridae*.

Se ha propuesto que VPg participa en el reclutamiento del ribosoma hacia el RNA viral. La evidencia de la hipótesis sobre que VPg recluta maquinaria de traducción para el RNA viral surge de datos que mostraron la interacción de esta proteína directa y

específicamente con el factor de iniciación de la traducción eIF3 y con las subunidades 40S ribosomales. Lo descrito anteriormente implica un nuevo mecanismo de iniciación de la traducción mediado por interacciones de tipo proteínas virales-proteínas con la maquinaria de traducción celular (6).

b.1.1.6) RdRp (RNA-dependent RNA polymerase): esta proteína va del aminoácido 1281 hasta el carboxilo terminal del ORF1, y se llama RNA-polimerasa dependiente de RNA. Se han identificado dos productos de corte que contienen a la RdRp: el ProPol (un precursor que contiene a la proteinasa y a la polimerasa) y la Pol (polimerasa madura) (9). Se han realizado estudios enzimáticos con proteínas recombinantes, los cuáles han confirmado al precursor 3CLpro-RdRp como una proteína bifuncional con actividades tanto de proteasa como de polimerasa (6).

b.1.1.7) 3CLpro: Los norovirus codifican para una única proteasa llamada 3C-like (3CL^{pro}) debido a su similitud con la 3C de los picornavirus (6). Esta proteasa pertenece a la familia de las cistein-proteinasas (7). Las proteinasas virales del tipo cisteína contienen una triada catalítica compuesta de una cisteína conservada, una histidina y residuos de ácido aspártico. Además, las proteinasas de esta familia comparten una homología estructural con las serin proteinasas (7).

La proteasa 3C de norovirus tiene un peso molecular de 19 kDa y está codificada en una región interna de la poliproteína precursora, hacia el lado carboxilo terminal, río arriba (upstream) de la RNA polimerasa dependiente de RNA (3D^{pol}). La 3C^{pro} es liberada por medio de un autoprosesamiento catalítico de la poliproteína precursora. Esta proteasa es la única con la que cuenta el NV para ejercer el procesamiento proteolítico de la poliproteína precursora (30).

Los sitios de corte reportados para esta proteasa son: Q-G, E-G y E-A. La importancia de conocer lo anterior es que se pueden predecir posibles sitios de corte en

un sustrato por esta proteasa (31).

Se sabe que un virus de la misma familia (*Caliciviridae*), el FCV, que codifica igualmente para una única proteasa (3C), ejerce un procesamiento proteolítico sobre la proteína celular PABP, lo cual parece ser una estrategia para inhibir la traducción celular; al igual que en el caso de los picornavirus, por lo que se sugiere que dicho procesamiento podría ser un mecanismo común usado por diferentes familias de virus para manipular la traducción del RNAm de la célula hospedera (29).

b.2) Replicación

Una vez que el RNA se ha traducido, la presencia de las proteínas virales induce que este RNA deje de traducirse y comience la síntesis de moléculas de RNA que formarán los genomas de la progenie viral.

La cadena original debe ser transcrita a otra de secuencia complementaria y de polaridad opuesta (Figura No.5); esta replicación ocurre en una estructura con varias ramificaciones. Este complejo, de estructura dinámica contiene moléculas como la transcriptasa viral (replicasa), algunos productos parcialmente sintetizados de cadenas de RNA (cadenas nacientes), y el genoma sentido que sirve como templado. El complejo de la ribonucleoproteína completa (RNP) se llama intermediario replicativo tipo 1 o RI-1, los productos de cadena sencilla generados de RI-1 son antisentidos al RNA genómico. Esta cadena complementaria de RNA sirve como templado para la formación de más cadenas genómicas en sentido. Este segundo intermediario replicativo (RI-2) es esencialmente igual en estructura al RI-1, excepto que la cadena templado es antisentido en relación al RNA genómico y las moléculas de RNA nacientes son el sentido del genoma.

Una vez que el genoma se encapsida, se forman las partículas virales, las cuales infectan las células aledañas (24).

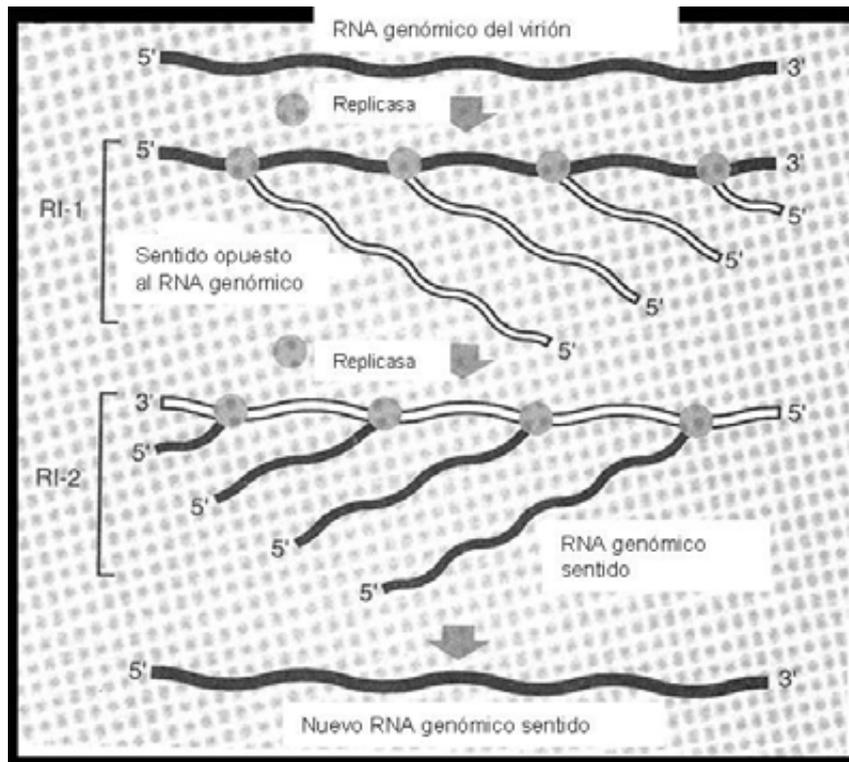


Figura No. 5: Características generales de los virus que contienen genomas de RNA que utilizan una transcripción del RNA dirigida por RNA. Se muestran las reglas básicas para la replicación del RNA dirigida por RNA, la nueva (naciente) cadena se sintetiza en sentido 5' a 3' en sentido antiparalelo al templado. Tomado de Wagner, E. 1999.

La participación de factores celulares durante la replicación de los virus es fundamental debido principalmente a que los virus de RNA (+), como NV, son muy austeros y no pueden sintetizar la maquinaria para la formación de su progenie, sin embargo, éstos son capaces de desarrollar estrategias para permitirles apoderarse de la maquinaria celular para su beneficio.

Una de las moléculas virales que participa más activamente en el establecimiento de la infección son las proteasas. Estas además de procesar a sus propias proteínas para su maduración, son capaces de procesar y modificar el contexto celular en beneficio de la infección, por ejemplo, inhiben funciones celulares para que el virus las ocupe o relocalizan proteínas para hacerlas más accesibles durante la infección viral (24).

1.9 Proteasas

a) Definición y tipos

Una proteasa se define como una enzima que hidroliza enlaces peptídicos. Las proteasas pueden dividirse de acuerdo a su sitio de acción en endopeptidasas o proteinasas, las cuales cortan enlaces peptídicos internos en las proteínas, y en exopeptidasas, las cuales lo hacen en enlaces peptídicos en los extremos terminales. A su vez las exopeptidasas se subdividen en aminopeptidasas y carboxipeptidasas, dependiendo del extremo de la proteína donde corta a los aminoácidos (13).

La posición espacial de los aminoácidos que constituyen el sitio catalítico está conservado en la naturaleza y provee las bases para la clasificación de las proteinasas. Al respecto existen 4 clases de proteinasas: tipo serin, cisteín (ó tiol), aspártico y metaloproteinasa (14)

Las serin proteasas poseen una triada catalítica de aminoácidos formada por His (histidina), Asp (ácido aspártico), y Ser (serina), la cual es la responsable del procesamiento. El residuo Ser es excepcionalmente reactivo y actúa como el nucleófilo durante la catálisis, esto lo hace donando un electrón al carbono carbonilo del enlace peptídico que va a ser hidrolizado.

Las cisteín proteinasas tienen una diada catalítica compuesta de residuos de Cys (cisteína) e His (histidina) que se encuentran cercanos y los cuales interactúan entre sí. Durante la proteólisis, el grupo sulfhidrilo del residuo de cisteína actúa como el nucleófilo para iniciar el ataque en el carbono carbonilo del enlace peptídico que va a ser hidrolizado. Se ha sugerido que durante este proceso el anillo de imidazol del sitio activo quita un protón del sulfhidrilo, y lo hace más nucleofílico. Una acil enzima se forma a través del carbono carbonilo del sustrato y el grupo sulfhidrilo del sitio activo de la cisteína. El aminoácido saliente es protonado por el sitio activo de la histidina y

posteriormente el carbono carbonilo es hidrolizado del grupo tiol de la proteinasa, y así el sitio activo es regenerado.

En las proteinasas tipo aspártico y en las metaloproteinasa no aparecen los intermediarios unidos covalentemente de enzima-sustrato. Las proteinasas tipo aspártico están compuestas de una diada catalítica de dos residuos de Asp (ácido aspártico), el mecanismo de la catálisis aún no se conoce claramente; se ha propuesto una catálisis ácido-base. En el grupo de las metaloproteinasa un catión divalente, el cual es frecuentemente Zn^{+2} , está presente en el sitio catalítico (14).

Para describir la secuencia del sitio de corte de una proteinasa y el sitio de unión del sustrato hay una nomenclatura que fue propuesta por Schechter y Berger en 1967, y consiste en lo que a continuación se presenta.

En la figura No.6 un péptido, que es el sustrato, se presenta en la parte superior de la figura compuesto de 10 aminoácidos (aa), el enlace peptídico que va a ser procesado está indicado con una flecha. Los aminoácidos del lado N-terminal del "scissile bond" están marcados como P1 a P5, y los aminoácidos del lado carboxilo terminal se marcan con P1' a P5'; los dominios individuales (S y S'), los cuales colectivamente forman el bolsillo de unión al sustrato también se indican. Del S1 al S5 se unen a los aminoácidos P1 al P5 del sustrato, y el S'1 al S'5 se unen a través de los aminoácidos P'1 a P'5. La especificidad del sustrato se determina por la complejidad del bolsillo de unión al sustrato y puede consistir solamente en un aminoácido S1 o puede ser más complejo, como se muestra en la figura, interactuando con varios aminoácidos sustrato (14).

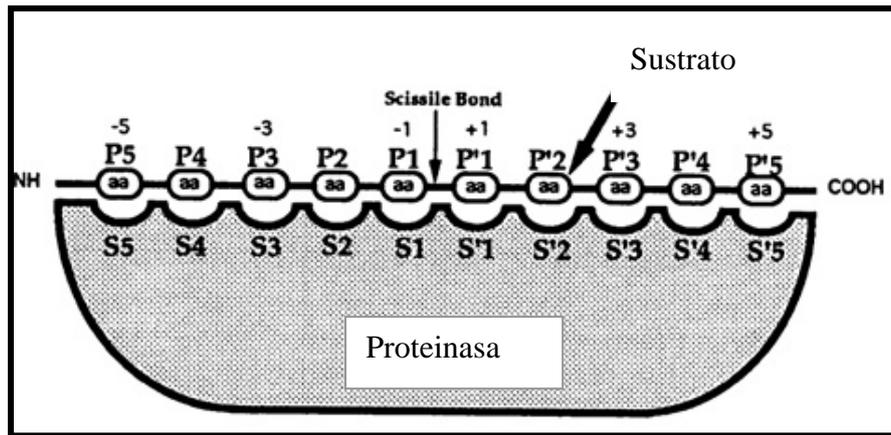


Figura No. 6: Representación esquemática de una proteínasa y su sustrato. Tomada de Dougherty, W. 1993.

b) Proteinasas virales

El concepto sobre una proteínasa involucrada en la expresión del genoma del virus fue sugerido primero con el virus de la polio y el bacteriófago T4. Aunque el concepto de que los virus codificaban para una proteínasa aún no estaba propuesto, Summers y Maizal en 1968 fueron los primeros en sugerir que durante la expresión genética de poliovirus, los precursores sintetizados inicialmente sufrían un procesamiento para llegar a los productos finales. Posteriormente a mediados de los años 70's se sugirió que durante la replicación del bacteriófago T4 estaba involucrado un procesamiento proteolítico (14).

Las proteinasas juegan un papel clave en la expresión genómica de muchos virus que infectan a hospederos de células eucariotas; al respecto se sabe de una o más proteinasas tanto virales como celulares que pueden estar involucradas. Las proteinasas del hospedero frecuentemente participan en la maduración de proteínas virales, que eventualmente están asociadas con la envoltura del virus. Estas enzimas probablemente son proteinasas cuyo blanco son los péptidos señal de las proteínas virales de la envoltura, iniciando así un camino que resultará en un extenso número de

modificaciones post-traduccionales. En este caso, las proteínas virales probablemente siguen la vía secretora de la célula hospedera y son procesadas y modificadas en el retículo endoplásmico, en el aparato de Golgi y orientada hacia la membrana citoplásmica.

Las proteinasas codificadas por los virus desempeñan principalmente 2 funciones durante su ciclo de replicación; primero, la mayoría de ellas están involucradas en la expresión genética por medio del autoprosesamiento en la poliproteína para liberarse y originar productos de genes funcionales. La segunda función involucra de manera general la maduración de proteínas estructurales durante el proceso de ensamblaje del virión, esto generalmente es el último paso en el ciclo de replicación del virus y generalmente precede a la formación de los viriones como entidades identificables estructuralmente (14).

Como ya se mencionó, la mayoría de los sistemas virales utilizan un procesamiento proteolítico para procesar a la poliproteína derivada del genoma a precursores intermediarios y a productos procesados. Al respecto se observan 2 tipos de procesamientos: 1) en *cis* o reacción monomolecular y en *trans* o reacción bimolecular. En los eventos en *cis*, la proteinasa y el sitio de corte están presentes en el mismo precursor. Esta reacción es independiente de la dilución y sigue una cinética de orden cero. Los sitios de corte deben de flanquear a la proteinasa y deben ser usados para liberar a la proteinasa del precursor. Los sitios de corte pueden estar también distales, y su hidrólisis resulta en la liberación de la proteinasa en forma de una poliproteína intermediaria. Frecuentemente, las reacciones en *cis* son considerablemente rápidas y ocurren co-traduccionalmente; a éstas reacciones se les refiere con el nombre de autocatalíticas.

La reacción *en trans* se ejemplifica con una proteína que tiene actividad

proteolítica la cual procesa una segunda molécula conteniendo el sitio de corte. Esta es una reacción bimolecular que procede con una cinética de segundo orden y es sensible a una dilución (14).

Otra de las funciones desempeñadas por las proteinasas virales es la de involucrarse en el establecimiento de la infección mediante el procesamiento de factores celulares, inhibiendo funciones importantes para la célula. Tal es el caso de las proteasas 2A y 3C de polio, que procesan factores del inicio de la transcripción y traducción, inhibiendo ambos procesos en favor de su propia traducción. Así mismo procesa otras proteínas presentes en diferentes compartimentos celulares, lo cual trae como consecuencia en muchos casos su relocalización al citoplasma y su interacción con diferentes moléculas virales para participar en los diversos pasos del ciclo replicativo. Un ejemplo de ello es la acción de las proteasas de PV sobre la proteína celular La (32).

1.10) Proteína La

La proteína La es una fosfoproteína nuclear muy abundante y participa en la transcripción de los RNAs recién sintetizados por la RNA polimerasa III. Esta proteína también llamada (SS-B) fue descrita primero como un autoantígeno en pacientes que tenían lupus eritematoso sistémico y el síndrome Sjogren's. Aunque la proteína La se caracterizó primero como una proteína humana, hay homólogos identificados en una amplia variedad de células eucariotas de diversos orígenes.

Para la mayoría de los RNAs celulares La se une a los precursores, antes que a los RNAs maduros. La razón de esta unión es porque parte del sitio de reconocimiento de esta proteína es UUUOH, el cual está en el extremo 3' de todos los transcritos recién sintetizados por la RNA polimerasa III. Esta uridilación es removida durante la maduración del RNA, y por lo tanto se elimina el sitio de unión para La.

Esta proteína es extremadamente abundante, La en humanos se estima presente en 2×10^7 copias por célula. Gracias a la técnica de inmunofluorescencia se sabe que La se encuentra en su mayoría en el núcleo y, dentro del núcleo es tanto nucleoplásmica como nucleolar.

Aunque La en su mayoría se encuentra en el núcleo bajo condiciones celulares normales, una fracción de ella se vuelve citoplásmica en ciertas circunstancias, como por ejemplo durante la infección de poliovirus en células de mamíferos, una porción de la proteína La es relocalizada hacia el citoplasma, para esto se sugiere que la proteasa codificada por el virus de la polio ejerce un procesamiento en La del lado carboxilo terminal, removiendo de esta manera la señal de localización nuclear. De manera similar, la proteína La se vuelve citoplásmica durante el proceso de apoptosis en células de mamíferos, posiblemente permitiendo la remoción de la señal de localización nuclear por una proteasa del tipo caspasa (12).

Debido al tipo de unión que hace La por mucho tiempo se asumió que su función era en algún aspecto de la biogénesis de los RNAs. Recientemente el papel de esta proteína se ha establecido más claramente: su función principal es la de proteger el extremo 3' de los nacientes y pequeños RNAs de la digestión de las exonucleasas. Aunque se sabe poco de su papel en los procesos en donde se involucran RNAs largos, se ha propuesto que esta proteína facilita la traducción de ciertos mRNAs tanto celulares como virales (12).

La se asocia con un gran número de RNAs nacientes pequeños, así como a los RNAs virales, por ejemplo con el virus de Epstein-Barr, el Adenovirus, y al RNA genómico de varios virus de polaridad negativa.

Particularmente la proteína La tiene un papel indispensable en la traducción del virus de la polio. Brevemente, cuando PV infecta a la célula, este se traduce y produce

cantidades incipientes de proteína viral, ya que este RNA debe competir con los RNAm celulares por la maquinaria traduccional celular. Sin embargo, la presencia de las proteasas virales, aunque en bajas cantidades, produce el procesamiento de factores de la traducción y la relocalización de la proteína La del núcleo hacia el citoplasma debido a que procesa la secuencia de localización nuclear (32).

La presencia de la proteína La en el citoplasma, la hace accesible a su interacción con el RNA de PV. Esta interacción es indispensable para promover la unión del ribosoma con el RNA y con ello lograr una eficiente síntesis de proteínas virales. La proteína La es tan importante durante el ciclo replicativo viral que PV no puede traducirse in vitro en extractos celulares carentes de proteína La.

Así mismo, se ha determinado que esta proteína es indispensable en la replicación del RNA de otros virus de RNA (+).

En el caso de NV, estudios en nuestro laboratorio han demostrado que La interactúa con su genoma, específicamente en la región no traducida 3' de 66 nucleótidos. Esto es importante ya que el inicio de la síntesis de la cadena de polaridad negativa de RNA ocurre en este sitio. Estos complejos RNA-proteína se piensa podrían contribuir con el reclutamiento y a la estabilización de la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) en los sitios de iniciación para la síntesis del RNA viral (28).

2.- JUSTIFICACIÓN

Las proteínas celulares juegan un papel crucial durante la replicación de los virus de RNA de polaridad positiva. Esta se lleva a cabo en el citoplasma celular, sin embargo algunas proteínas localizadas en el núcleo participan de manera indispensable durante la síntesis de las proteínas y el RNA viral.

Se ha documentado que los virus desarrollan estrategias para que estas proteínas estén accesibles durante su replicación; una de ellas es la participación de las proteasas virales en la relocalización, ya sea mediante el procesamiento de un factor particular o por medio de proteínas que desestabilizan los compartimientos celulares permitiendo la salida de proteínas al citoplasma.

La proteína La durante la infección por poliovirus es relocalizada al citoplasma mediante la participación de su proteasa 3C, con lo que el virus puede replicarse más eficientemente. Por lo anterior, es probable que el virus Norwalk, poseedor de una proteasa semejante, pueda relocalizar a la proteína La y que esta participe en la replicación de este virus.

3.- HIPÓTESIS

Si la proteasa 3C del virus de la polio ejerce un procesamiento proteolítico sobre la proteína La; entonces es posible que la proteasa 3C del virus Norwalk ejerza el mismo procesamiento sobre ésta proteína.

4.- OBJETIVO GENERAL

1.- Clonar la proteína 3C del virus Norwalk y realizar ensayos de procesamiento proteolítico sobre la proteína celular recombinante La.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1.- Clonar el gen de la proteína 3C del virus Norwalk en el vector de expresión procarionte pPROExTM HTb.

2.- Determinar las condiciones de expresión de la proteína recombinante 3C del virus Norwalk.

3- Realizar la purificación de la proteína recombinante 3C del virus Norwalk.

4.- Realizar ensayos de procesamiento *in vitro* de la proteína recombinante La en presencia de la proteasa recombinante 3C del virus Norwalk.

5.- METODOLOGÍA

5.1 PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE *Escherichia coli* POR EL MÉTODO DE CLORURO DE RUBIDIO.

- Crecer una asada de bacterias en medio Luria líquido sin antibiótico durante toda la noche a 37°C.
- Inocular 1 mL del cultivo de toda la noche a 100 mL de medio Luria e incubar a 37°C en agitación hasta que la densidad óptica llegue a 0.48.
- Incubar en hielo por 15 minutos.
- Centrifugar las células a 5000 rpm durante 5 minutos.
- Desechar el sobrenadante y agregar 0.4 del volumen original del buffer TfbI, resuspender e incubar en hielo por 15 minutos.
- Centrifugar las células a 5000 rpm durante 5 minutos.
- Desechar el sobrenadante y resuspender en 0.04 del volumen original con buffer TfbII, incubar en hielo por 15 minutos y usarlas de inmediato ó congelarlas a -70°C

5.2 TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS.

- Retirar las células del congelador a -70°C y colocarlas en hielo.
- Agregar 1 µL del plásmido a propagar.
- Incubar 30 minutos en hielo.
- Incubar 90 segundos a 42°C, posteriormente incubar 2 minutos en hielo y agregar 200 µL de medio Luria sin antibiótico
- Incubar 1 hora a 37°C y pasado este tiempo espatular las bacterias en una caja Petri con medio Luria con ampicilina.
- Incubar toda la noche a 37°C y posteriormente observar el crecimiento de las bacterias, el cual debe de ser en colonias aisladas.

5.3 AMPLIFICACIÓN DEL GEN QUE CODIFICA PARA LA 3C POR PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).

- Diseñar los oligonucleótidos a utilizar en la reacción:

3C3' Xho TTTCTCGAGTTCTAGTGCGGTTTCGCCCTCTCC

3C5' Xho

TTTCTCGAGATGTTTAAGCTCCCCGACACTATGGAGCCGAGTC

- Preparar la mezcla de reacción:

| Reactivo | Volumen (μL) por reacción |
|-------------------------------------|---------------------------|
| H ₂ O | 8.45 |
| Buffer | 1 |
| Dinucleotidos trifosfatados (dNTPs) | 0.25 |
| Oligonucleótidos | 0.125 |
| Taq polimerasa | 0.05 |

- Calcular la temperatura de hibridación con la siguiente fórmula:
 $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$.

- Establecer 35 ciclos de PCR con las siguientes temperaturas:

| Etapa | Temperatura (°C) | Tiempo |
|-------------------|------------------|-------------|
| Desnaturalización | 94 | 3 minutos |
| Desnaturalización | 94 | 30 segundos |
| Hibridación | 60 | 40 segundos |
| Alargamiento | 68 | 1 minuto |
| Alargamiento | 68 | 7 minutos |

- Terminada la PCR correr en un gel de agarosa para ver el producto esperado ó guardar a -4°C para ser analizado posteriormente.

5.4 PREPARACIÓN DE GELES DE AGAROSA.

- Pesar la cantidad necesaria de agarosa según la concentración deseada.
- Disolver con TBE 1X hasta observar una solución cristalina.
- Agregar 1 μL de bromuro de etidio y desechar la punta de la micropipeta utilizada inmediatamente en el bote de RPBI.
- Verter la solución preparada al carro de la cámara, el cual previamente fue sellado de los extremos.
- Colocar el molde de los carriles y esperar a que la agarosa gelifique perfectamente bien.
- Posteriormente retirar el molde, colocar el carro dentro de la cámara de electroforésis y agregar buffer TBE 0.5X hasta cubrir el gel.
- Preparar la muestra con buffer de corrida y observar en el transiluminador.

5.5 SUBCLONACIÓN DEL GEN 3C CON GeneJet™ PCR Cloning Kit .

- Preparar la siguiente mezcla de reacción:

| Componente | Volumen (μL) |
|---------------------------------|----------------|
| Buffer de reacción 2X | 10 |
| Producto de PCR (no purificado) | 1-2 |
| Agua libre de nucleasas | completar a 17 |
| DNA Blunting Enzyme | 1 |
| Volumen total | 18 |

- Agitar en vortex brevemente y centrifugar de 3 a 5 segundos.
- Incubar la mezcla a 70°C por 5 minutos y enfriar por algunos segundos en hielo.
- Preparar la reacción de ligación (agregar a la mezcla de reacción):

| Componente | Volumen (μL) |
|-------------------------|--------------|
| pJET1/blunt™ (50 ng/μL) | 1 |
| T4 DNA Ligase (5 u/μL) | 1 |
| Volumen total | 20 |

- Agitar en vortex brevemente y centrifugar de 3 a 5 segundos.
- Incubar la mezcla de ligación a temperatura ambiente (22°C) durante 5 minutos. La incubación puede extenderse hasta 30 minutos para obtener el máximo número de transformantes.
- Usar directamente la mezcla de reacción para transformar células competentes de *E. coli* DH5α con 7 μL.

5.6 PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDO POR LA TÉCNICA DE LISIS ALCALINA (MINIPREPARACIÓN).

- Inocular 5 mL de medio Luria con el antibiótico de selección con una colonia de la clona o cepa a analizar, se incuba toda la noche a 37°C.
- Colocar 1.5 mL de bacterias en tubos Eppendorf. Centrifugar a 13000 rpm durante 30 segundos a 4°C.
- Descartar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 100 µL de la solución I agitando en vortex. Posteriormente agregar 200 µL de la solución II (la cual se prepara al momento), invertir varias veces y colocar en hielo.
- Agregar 150 µL de la solución III. Invertir el tubo varias veces e incubar 5 minutos en hielo. Centrifugar a 13000 rpm durante 6 minutos a 4°C.
- Transferir el sobrenadante a un tubo Eppendorf limpio y agregar un volumen igual de fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1), agitar en vortex y centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos a 4°C.
- Transferir la fase superior a otro tubo Eppendorf limpio. Precipitar el DNA agregando 2 volúmenes de etanol al 100%, agitar invirtiendo con la mano y dejar 2 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar los ácidos nucleicos a 13000 rpm por 5 minutos a 4°C. Retirar el sobrenadante y dejar secar la pastilla a temperatura ambiente.
- Finalmente la pastilla de DNA se resuspende en 30 µL de agua desionizada estéril, se le agrega 1 mL de RNasa A incubando la mezcla por 15 minutos a 37°C.
- Correr una muestra en un gel de agarosa el DNA obtenido ó guardar a 4°C para su posterior uso.

5.7 LIBERACIÓN DEL INSERTO 3C DEL PLÁSMIDO pJET1/blunt™+3C.

- Preparar la siguiente mezcla:

| Componente | Volumen (µL) |
|--|--------------|
| Plásmido | 29 |
| Enzima XhoI (<i>Xanthomonas holcicola</i>) | 4 |
| Buffer No. 2 | 40 |
| BSA (albúmina sérica bovina) | 4 |
| Agua estéril | 323 |
| Volumen final | 400 |

- Incubar la reacción a 37°C durante toda la noche.
- Correr 5 µL en un gel de agarosa al 0.8%.

5.8 PURIFICACIÓN DEL GEN 3C POR ELECTROELUCIÓN.

- Correr en un gel de agarosa al 1.5% todo el ensayo de restricción.
- Cortar el gel a la altura del inserto (3C) liberado.
- Colocar los trozos del gel en la cámara de electroelución.
- Rellenar los pozos de la cámara con acetato de amonio ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) 10M con azul de bromofenol.
- Colocar buffer TBE 0.5X hasta el borde de la cámara y correr a 150 v por 1 hora.
- Una vez terminado el tiempo recuperar toda la solución que se encuentra en el pozo y colocarlo en un tubo Eppendorf.
- Agregar 2 volúmenes de etanol frío y colocar a -70°C durante 1 hora.
- Centrifugar a 12000 rpm por 30 minutos a 4°C .
- Decantar y dejar secar la pastilla
- Agregar 30 μL de agua de ampolla y resuspender el DNA.

5.9 OBTENCIÓN DEL VECTOR pPROEX[™] HTb, RESTRICCIÓN Y DESFOSFORILACIÓN.

- Transformar bacterias *E. coli* DH5 α con 1 μ L del plásmido pPROEx[™] HTb.
- Resembrar una colonia en 100 mL de medio Terrific y dejar crecer durante toda la noche a 37°C.
- Centrifugar las bacterias a 6000 x g por 15 minutos a 4°C.
- Resuspender la pastilla en 10 mL del buffer P1.
- Agregar 10 mL del buffer P2, mezclar invirtiendo el tubo de 4 a 6 veces, e incubar a temperatura ambiente (15-25°C) por 5 minutos.
- Agregar 10 mL del buffer P3 frío, mezclar inmediatamente e invertir vigorosamente de 4 a 6 veces, incubar en hielo por 20 minutos.
- Centrifugar a 20000 x g por 30 minutos a 4°C. Retirar el sobrenadante que contiene el DNA.
- Centrifugar el sobrenadante nuevamente a 20000 x g por 15 minutos a 4°C. Remover el sobrenadante que contiene el DNA.
- Equilibrar una columna QIAGEN-tip 500 con 10 mL del buffer QBT y permitir que la columna se vacíe por gravedad.
- Agregar el sobrenadante anterior a la columna y permitir que entre a la resina por gravedad.
- Lavar la columna con 30 mL del buffer QC
- Eluir el DNA con 15 mL del buffer QF.
- Precipitar el DNA agregando 10.5 mL de isopropanol a temperatura ambiente al DNA eluido. Mezclar y centrifugar inmediatamente a 15000 x g durante 30 minutos a 4°C. Decantar el sobrenadante cuidadosamente.
- Lavar la pastilla de DNA con 5 mL de etanol al 70% a temperatura ambiente y centrifugar a 15000 x g durante 10 minutos. Decantar cuidadosamente el sobrenadante sin revolver la pastilla.
- Dejar secar a temperatura ambiente la pastilla durante 5 a 10 minutos, redissolver el DNA con el buffer conveniente (buffer TE pH 8.0 o Tris-HCl 10 mM pH 8.5).
- Correr una muestra en gel de agarosa.
- Restricción del plásmido con la enzima XhoI con el kit Fermentas[™] Fast Digest.

- Preparar la siguiente reacción:

| Componente | Volumen (μL) |
|---------------|-------------------------------------|
| Agua | 75.78 |
| Buffer | 10 |
| DNA | 11.72 (para tener 5 μg) |
| XhoI | 2.5 |
| Volumen final | 100 |

- Incubar durante 2 horas a 37°C
- DESFOSFORILACIÓN DE pPROEX™ HTb:
 - Solución 1: Agregar 100 μL de isopropanol e incubar a -72°C por 30 minutos.
 - Centrifugar 20 minutos a 12000 rpm y desechar el alcohol de un solo movimiento.
 - Agregar 10 μL de agua estéril y 4 μL de buffer de desfosforilación.
 - En otro tubo preparar la solución 2: 4 μL de fosfatasa y 4 μL de buffer de dilución.
 - De la mezcla anterior tomar 4 μL y agregarlos a la mezcla donde se encuentra el DNA y llevar la solución a un volumen de 40 μL con agua estéril.
 - Incubar 30 minutos a 37°C y posteriormente agregar los 4 μL restantes de la solución 2.
 - Incubar 30 minutos a 37°C y finalmente correr en un gel al 1% o guardar a -20°C para su posterior uso.

5.10 LIGACIÓN DEL DNA (pPROEX™ HTb + 3C) PARA OBTENER EL PLÁSMIDO PC3C.

- Preparar la reacción de ligación:

| Componente / reacción | Control (µL) | Ligación 1 (µL) | Ligación 2 (µL) | Ligación 3 (µL) |
|-----------------------|--------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Vector: pPROEX™ HTb | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Inserto: 3C | - | 2 | 3 | 4 |
| Agua | 5.1 | 3.1 | 2.1 | 1.1 |
| Volumen final | 6.1 | 6.1 | 6.1 | 6.1 |

- Incubar la mezcla anterior a 68°C durante 3 minutos.
- Terminado este tiempo colocar los tubos inmediatamente en hielo y preparar el cocktail agregando en orden los reactivos que a continuación se indican:

| Componente | Volumen (µL) |
|-------------------------------|--------------|
| Buffer de ligasa 10X | 1 |
| ATP 10 mM | 0.5 |
| BSA 10 mg/ml | 0.1 |
| Ligasa T4 DNA 1 Weiss Unit/ml | 0.3 |

Nota: las cantidades que se muestran son por reacción.

- Agregar el cocktail anterior al DNA que se encuentra en el hielo.
- Incubar durante 4 horas a temperatura ambiente y posteriormente guardar a 4°C.
- Inactivar la ligasa incubando a 65°C las reacciones por 10 minutos.
- Transformar bacterias *E. coli* DH5α.

5.11 PCR COLONY.

- Preparar la siguiente mezcla :

| Componente | Volumen (μL) |
|------------------|---------------------------|
| H ₂ O | 8.45 |
| Buffer | 1 |
| dNTPs | 0.25 |
| Oligonucleótidos | 0.125 |
| Taq polimerasa | 0.05 |

Nota: los volúmenes son para una reacción multiplicar por el número necesario.

- Colocar el volumen deseado en cada tubo.
- Con un asa de siembra estéril seleccionar la colonia a analizar, sembrar en estría en una nueva caja con medio y antibiótico y posteriormente colocar el resto en el tubo que contiene la mezcla de reacción.
- Realizar el ciclo de PCR.
- Analizar el producto obtenido en un gel de agarosa.

5.12 EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE 3C.

- Crecer 500 mL de cultivo de bacteria en medio Luria con el antibiótico de selección hasta la densidad óptica (D.O.) a $\lambda=600$ nm de 0.8 a 1.
- Adicionar isopropil- β -D-tio-galactósido (IPTG) a una concentración final de 1 mM e incubar por 4 horas a 37°C en agitación.
- Centrifugar las bacterias a 4000rpm por 15 minutos a 4°C.
- Desechar el sobrenadante y agregar por cada 2 gramos de bacteria 8 mL del buffer de lisis y 100 μ L de lisozima.
- Incubar en hielo por 30 minutos, posteriormente sonicar por 6 ciclos de 30 segundos cada uno.
- Centrifugar a 12000 rpm por 15 minutos a 4°C, recuperar el sobrenadante.
- Para la purificación de la proteína recombinante realizar la precipitación con sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 40%.
- Colocar el sobrenadante recuperado en un vaso de precipitado, el cual debe estar en hielo y con agitación.
- Pesar la cantidad necesaria de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, tomando como base la relación de 11.3 gramos para 100 mL a precipitar.
- Agregar lentamente el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y esperar a que aparezca el precipitado.
- Recuperar toda la solución precipitada, colocarla en tubos Eppendorf y centrifugar a 12000 rpm a 4°C por 6 minutos.
- Desechar el sobrenadante y resuspender la pastilla con buffer de diálisis.
- Dejar dializando toda la noche a 4°C.
- Posteriormente recuperar la solución dializada y correr una muestra en un gel de poliacrilamida al 15%.
- Después de correr el gel teñirlo con solución de Coomassie por 10 minutos en agitación.
- Desteñir con la solución desteñidora hasta que se observen claramente las bandas de las proteínas y de los marcadores de peso molecular.

5.13 PREPARACIÓN DE GELES DE ACRILAMIDA-BISACRILAMIDA DESNATURALIZANTES PARA PROTEÍNAS.

- Preparar las siguientes mezclas, según sea necesario, en un vaso de precipitado:

GEL SEPARADOR

| SOLUCIÓN | GEL al 10% (mL) | Gel al 15% (mL) |
|----------------------|-----------------|-----------------|
| Solución A | 3.3 | 5 |
| Solución B | 3.7 | 3.7 |
| Solución C | 0.1 | 0.1 |
| Agua | 2.7 | 2 |
| Persulfato de amonio | 40 μ L | 40 μ L |
| TEMED | 16.6 μ L | 16.6 μ L |

GEL CONCENTRADOR

| SOLUCIÓN | Volumen |
|----------------------|-------------|
| Solución A | 665 μ L |
| Solución D | 625 μ L |
| Solución C | 50 μ L |
| Agua | 3.6 mL |
| Persulfato de amonio | 100 μ L |
| TEMED | 5 μ L |

- Preparar las muestras que se van a correr con buffer de muestra 2X, de manera que queda 1X dependiendo del volumen de la muestra.
- Hervir las muestras por 3 minutos.
- Colocar 10 μ L de marcadores de tamaño molecular.
- Cargar las muestras en los pozos y correr a un voltaje máximo de 150 v.
- Esperar que el buffer de muestra empiece a salir del gel y en este momento parar el voltaje.

5.14 ENSAYOS DE CORTE SOBRE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE La.

- Alicuotar las siguientes cantidades en tubos Eppendorf:

| Reactivos | Control | Lar + 3Cr | r3C control |
|--|--------------------|--------------------|--------------------|
| Lar (0.541 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) | 1.5 μg | 1.5 μg | ----- |
| Buffer de corte | 1.39 μL | 1.94 μL | 1.1 μL |
| 3Cr | ----- | 4.5 μg | 4.5 μg |

- Incubar a 37°C durante toda la noche.
- Correr las muestras en un gel de acrilamida-bisacrilamida al 10%
- Realizar Western-Blot, utilizando anticuerpo primario α -La 1:1000 en PBST 0.5% con leche al 1%. Y de anticuerpo secundario α -conejo 1:15000 preparado de la misma forma.

5.15 WESTERN BLOT.

- Transferir las proteínas a un papel de nitrocelulosa con un voltaje de 16 v por 45 minutos.
- Teñir la membrana con rojo de Ponceau para observar las proteínas transferidas.
- Indicar los marcadores de pesos moleculares con un lápiz de punta chata.
- Cortar la membrana al tamaño del gel.
- Desteñir con PBS 1X.
- Bloquear la membrana con leche al 5% en PBS 1X por 1 hora a 37°C en agitación ó a 4°C toda la noche.
- Lavar rápidamente la membrana con PBS 1X
- Agregar el anticuerpo primario en PBST 0.5% con la dilución necesaria y dejar interactuar 1 hora a 37°C en agitación ó toda la noche a 4°C.
- Realizar 5 lavados con PBST 0.5% por 5 minutos cada uno.
- Agregar el anticuerpo secundario en PBST 0.5% con la dilución necesaria y dejar interactuar 1 hora a 37°C en agitación.
- Realizar 5 lavados con PBST 0.5% por 5 minutos cada uno.
- Colocar la membrana en PBS 1X.
- Revelar utilizando el kit llamado FEMTO™:
- Sacar la membrana del PBS 1X y retirar el exceso de solución.
- Mezclar 1 a 1 las soluciones del FEMTO™.
- Bañarla membrana por un minuto.
- A partir de este momento es necesario trabajar en oscuridad:
 - Secar el exceso de solución de la membrana.
 - Colocar en el cassette la membrana y cubrir con una placa.
 - Cerrar el cassette y esperar 1 minuto, pasado este tiempo colocar la placa en el revelador por aproximadamente 1 minuto, enjuagar con agua corriente y meter la placa en el fijador.
 - Repetir lo anterior para placas con exposiciones de 5 minutos y una hora.

6.- RESULTADOS

6.1) AMPLIFICACIÓN DEL GEN QUE CODIFICA PARA LA PROTEÍNA 3C DEL VIRUS NORWALK.

El objetivo de este trabajo fue la clonación de la proteína 3C del virus Norwalk; para lo cual primeramente se inició con la amplificación del gen que codifica a esta proteína a partir del DNA complementario del genoma del virus por medio de la técnica de PCR. Para esto fue necesario el diseño de oligonucleótidos, los cuales flanquean a los extremos 5' y 3' de la secuencia del gen de la 3C. Éstos oligonucleótidos son:
3C3' Xho TTTCTCGAGTTCTAGTGCGGTTTCGCCCTCTCC y el
3C5' Xho TTTCTCGAGATGTTTAAGCTCCCCCGACACTATGGAGCCGAGTC.

Adicionalmente, con la finalidad de clonar a la secuencia en un plásmido de expresión, se añadieron en los extremos de cada oligonucleótido los sitios de corte de la enzima de restricción XhoI.

Una vez que se realizó la PCR, el producto de amplificación se analizó en un gel de agarosa al 2% y se observó de un tamaño molecular de aproximadamente 547 bp, lo cual coincidió con el tamaño reportado del gen (Figura No. 7).

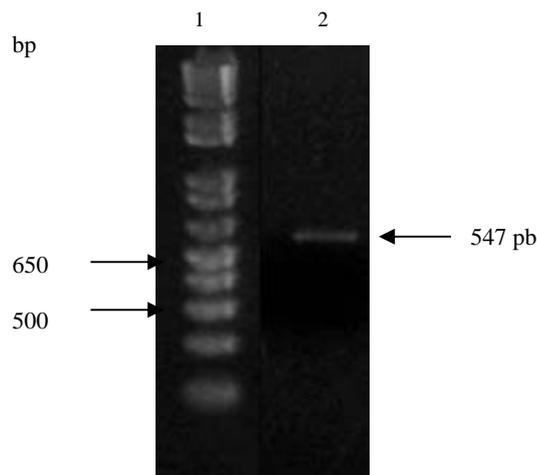


Figura No 7: Amplificación por PCR del gen 3C del virus Norwalk. Síntesis por PCR del gen de la proteasa 3C del virus Norwalk (carril 2). Los marcadores de tamaño molecular se muestran en el carril 1. La flecha indica el tamaño del producto.

6.2) PURIFICACIÓN DEL PLÁSMIDO PJET1/blunt +3C POR LA TÉCNICA DE LISIS ALCALINA.

Con la finalidad de clonar el producto de PCR en un plásmido de expresión, primero fue necesario clonar el producto en un vector aceptor de productos de PCR y a partir de éste escindir la secuencia de la 3C con la enzima XhoI para poder subclonarla. Esta primera clonación se hizo en el vector pJET1/blunt™ de 3128 pb (Figura No. 8) debido a que es un vector de selección positiva para las clonas que contienen a la secuencia del gen 3C, siendo éstas las únicas colonias que crecen sobre el agar, ya que las que no logran incorporar el inserto durante la transformación no crecen debido a que el vector contiene un gen letal que codifica para una endonucleasa de restricción el cual es letal para *E. coli*.

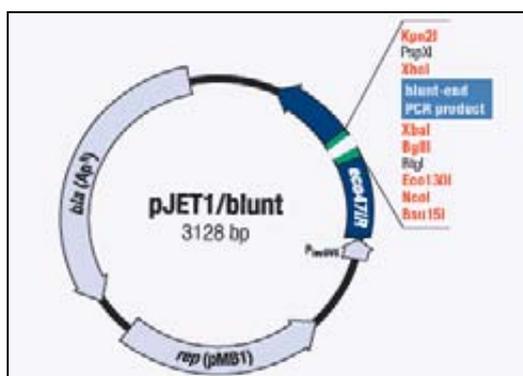


Figura No. 8. Mapa del vector pJET1/blunt

Después de realizar el protocolo de ligación para productos de PCR con este vector se obtuvieron varios candidatos con la secuencia 3C; el plásmido de 3675 pb (Fig.9 carril 2,3,4,5), el cual ya contenía a nuestro inserto.

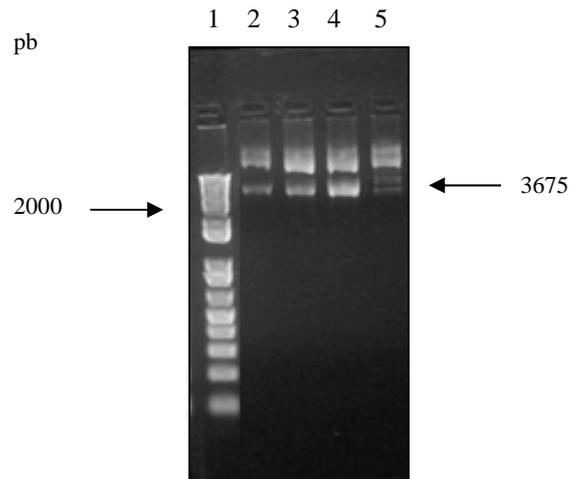


Figura No. 9. Purificación de clonas candidatas del plásmido pJET1/blunt™ + 3C. Los plásmidos obtenidos de las clonas candidatas fueron purificados y sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 1.5% (carriles 2-5). Carril 1: marcadores de tamaño molecular.

Una vez purificados los plásmidos candidatos, el siguiente paso fue realizar el ensayo de restricción con la enzima Xho I, para corroborar la presencia del inserto que contiene la secuencia del gen de la 3C; y asegurar que éste se encontraba perfectamente cortado de sus extremos.

Para asegurar lo anterior, las muestras cortadas fueron sometidas a electroforesis en geles de agarosa y observadas mediante un transiluminador. Como se muestra en los carriles 2 y 3 de la Figura No. 10, las dos clonas analizadas contienen el segmento esperado de 547 pb.

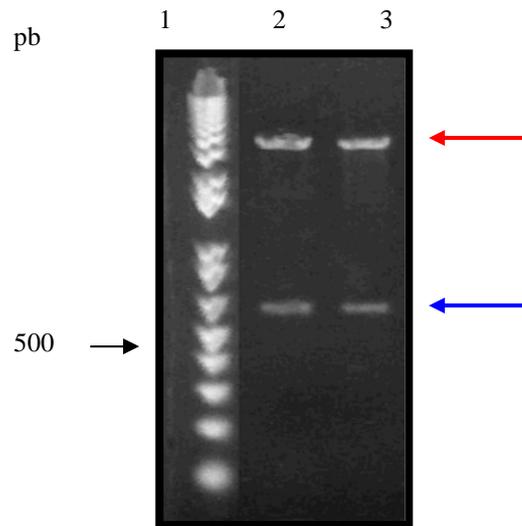


Fig No. 10. Restricción del plásmido pJET1/blunt™ + 3C. Dos plásmidos obtenidos de las clonas fueron cortados con la enzima de restricción XhoI y sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 2% (carril 2 y 3) donde en ambos casos se observa la liberación del inserto (flecha azul) y el plásmido pJET1/blunt linealizado (flecha roja). Carril 1: marcadores de tamaño molecular.

Una vez que ya se tenía el inserto liberado se procedió a su purificación por medio de la técnica de electroelución, y su recuperación se determinó por geles de agarosa al 2% (Fig. No. 11).

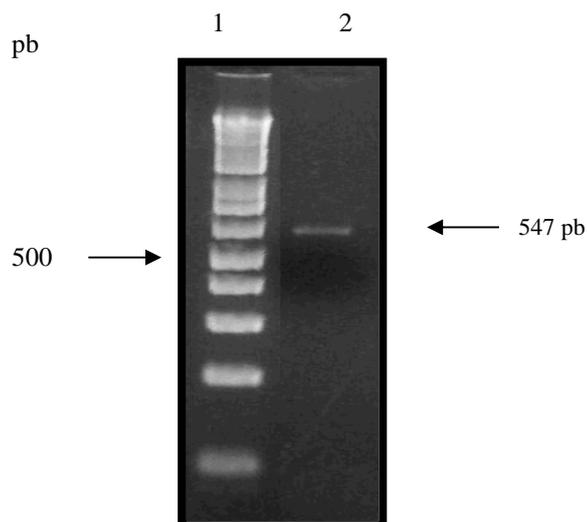


Figura No. 11. Purificación del gen que codifica para la proteína 3C del virus Norwalk. El inserto purificado (3C) se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 2%. Carril 1 marcadores de tamaño molecular.

Para poder expresar al gen de la proteasa 3C, fue necesario clonarlo en un vector de expresión, para lo cual el vector de clonación pPROEX™ HTb, se purificó y cortó con la enzima de restricción XhoI (Fig. No. 12 carril 3).

Para realizar la ligación del vector con el inserto, se desfosforiló al vector pPROEX™ HTb con la finalidad de evitar que sus extremos se unieran otra vez sin adquirir el fragmento y la mezcla fue utilizada para transformar bacterias DH5α. Como resultado de esta transformación se obtuvieron clonas con el plásmido que contenía al vector pPROEX™ HTb, al cual se le hizo un ensayo de restricción con la enzima XhoI.

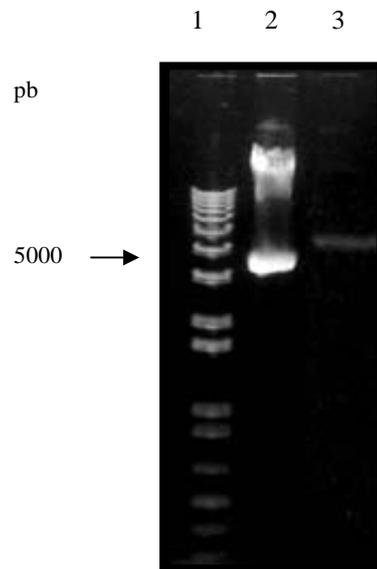


Figura No.12. Purificación del vector pPROEX™ HTb y restricción con la enzima XhoI. El vector se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%. En el carril 3 se observa una banda de 4779 pb, que corresponde al vector linealizado, y en el carril 2 se observa el vector sin restringir. Los marcadores de tamaño molecular se encuentran en el carril 1

Una vez que se contaba con el vector y el inserto restringido se realizó la transformación de bacterias *E. coli DH5a* con el nuevo plásmido PC3C y para determinar si las clonas bacterianas obtenidas contenían al plásmido PC3C se les realizó un PCR colony con los oligonucleótidos que amplifican al fragmento de 3C.

De las clonas analizadas, todas ellas resultaron positivas al PCR, indicando que todas contenían al plásmido con el inserto (Fig. No. 13).

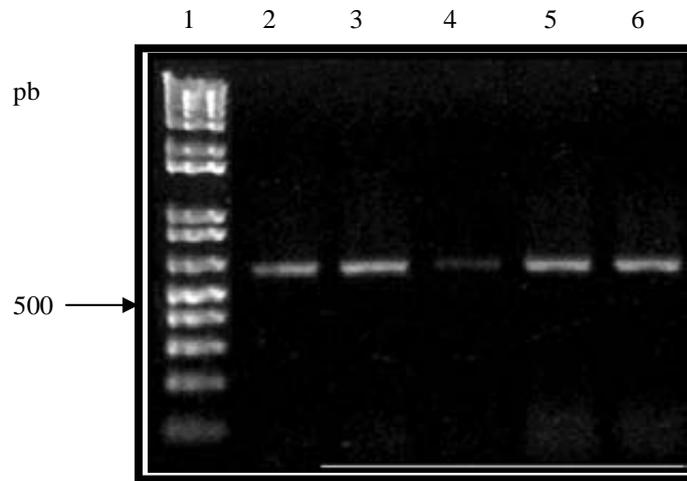


Figura No. 13. PCR colony de bacterias DH5 α transformadas con el plásmido PC3C. Colonias bacterianas candidatas fueron sometidas al mismo ciclo de amplificación que el cDNA viral con oligonucleótidos para amplificar al gen de la 3C, los productos obtenidos se sometieron a electroforesis en un gel al 2%. En los carriles 2, 3, 5 y 6 se observan los amplificados de las clonas. Carril 1: marcadores de tamaño molecular.

Para determinar si el inserto se encontraba clonado en el sentido correcto, se realizó un análisis por restricción enzimática del plásmido PC3C con la enzima EcoRI (Figura No. 15), ya que, se analizó que el corte del plásmido con esta enzima, liberaría un fragmento diferencial de DNA de 193 pares de bases, si se encontraba en sentido, o uno de 567 si estuviera en sentido inverso.

La representación del vector pPROEXTM HTb se muestra en la Figura No. 14 y se utiliza como referencia para calcular el lugar del inserto dentro del nuevo plásmido.

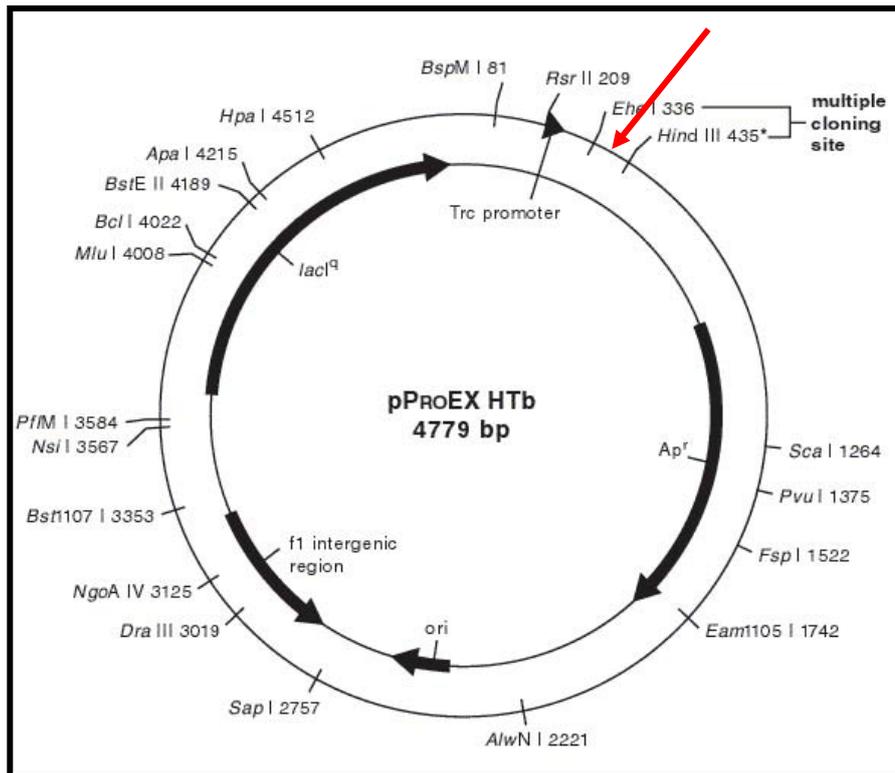
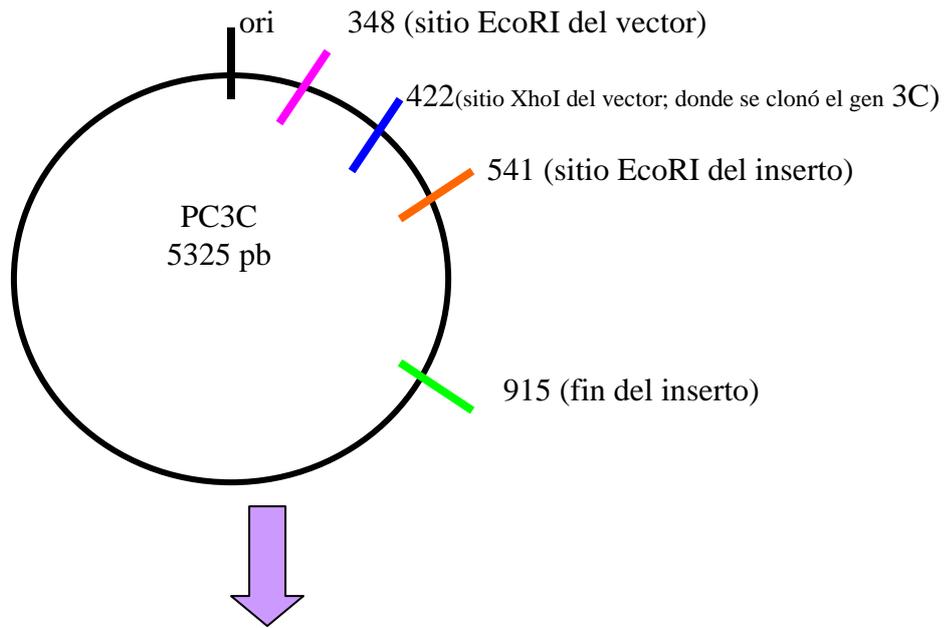


Figura No. 14. Mapa de restricción enzimática del vector de clonación pProEx™ HTb. El sitio de restricción para la enzima XhoI (sitio 418) se indica con una flecha roja.

Para determinar las clonas que se encontraban en sentido se obtuvieron los nuevos sitios para las enzimas de restricción (como el sitio 541 con línea naranja), y esto se hizo sumando el número de bp que se insertaron en el sitio de clonación para XhoI y considerando que todos los sitios se recorrieron de su lugar original. Para calcular el sentido se resta el sitio 541 menos 348, que da una liberación de 193 bp. Para el antisentido se resta 915 menos 348, lo cual da una liberación de 567 bp, como se puede observar en la Figura No. 15.



Haciendo una reacción de restricción con EcoRI:
 Se liberan los pedazos: de 193 pb si está en sentido o 567 si está en antisentido

Figura No. 15. Análisis teórico del plásmido candidato cortado con la enzima EcoRI.

Con base en lo anterior los plásmidos candidatos fueron cortados con la enzima EcoRI y analizados por electroforesis en geles de agarosa al 2% (Fig. No. 16). Con ello pudimos corroborar que 3 de las clonas (carriles 3-5) contenían el inserto en la orientación correcta y una (carril 1) en orientación inversa.

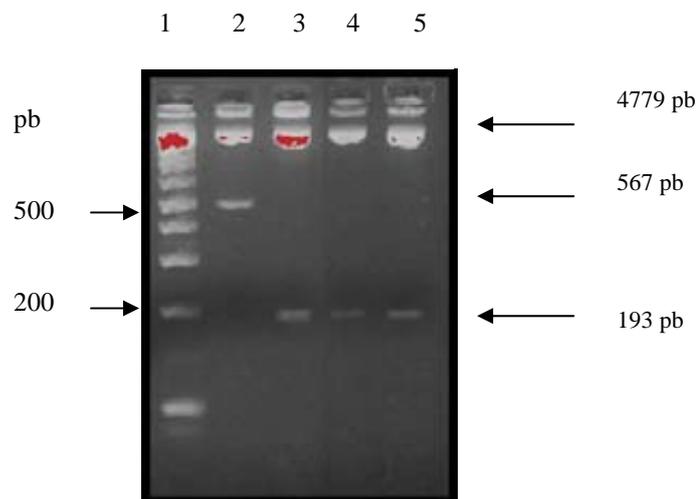


Figura No. 16. Análisis de restricción con la enzima EcoRI para determinar el sentido del inserto 3C. Los plásmidos candidato fueron analizados por restricción con la enzima EcoRI y los productos obtenidos se observaron por electroforesis en geles de agarosa al 2%. Clona antisentido (carril 2), clonas en sentido (carriles 3 al 5). Carril 1: marcadores de tamaño molecular.

Con la finalidad de corroborar que el plásmido que contenía al gen de la proteasa 3C en sentido no presentaba mutaciones se secuenció. Las bases marcadas que se encuentran en negro representan la secuencia del vector (pPRO EXTM HTb), y en azul las del gen que codifica para la proteasa (3C) de NV.

```
CACGATTACGATATCCCAACGACCGAAAACCTGTATTTTCAGGGCGCCATG
GGATCCGGAATTCAAAGGCCTACGTTCGACGAGCTCACTAGTCGCGGCCGCT
TTCGAATCTAGAGCCTGCAGTCTCGAGATGTTTGAAGCTCCCCGACACTAT
GGAGCCGAGTCACAAAGTTTGGATCAGGATGGGGCTTTTGGGTCAGCCCGA
CAGTGTTTCATCACAACCACACATGTAGTGCCAACTGGTGTGAAAGAATTCTT
TGGTGAGCCCCTATCTAGTATAGCAATCCACCAAGCAGGTGAGTTCACACA
ATTCAGGTTCTCAAAGAAAATGCGCCCTGACTTGACAGGTATGGTCCTTGAA
GAAGGTTGCCCTGAAGGGACAGTCTGCTCAGTCCTAATTAACGGGATTCG
GGTGAACTACTTCCGCTAGCCGTCCGTATGGGGGCTATTGCCTCCATGAGGA
TACAGGGTCGGCTTGCCATGGCCAATCAGGGATGTTACTGACAGGGGCCA
ATGCAAAGGGGATGGATCTTGGCACTATAACCAGGAGACTGCGGGGCACCAT
ACGTCCACAAGCGCGGGAATGACTGGGTTGTGTGTGGAGTCCACGCTGCAG
CCACAAAGTCAGGCAACACCGTGGTCTGCGCTGTACAGGCTGGAGAGGGCG
AAACCGCACTAGA ACTCGAGGCATGCGGTACCAAGCTTGGCTGTTTTGGCG
GATGAGAGAAGATTTTCAGCCTGATACAGATTAATCAGAACGCAGAAGCG
GTCTGATAAAACAGAATTTGCCTGGCGGCAGTAGCGCGGTGGTCCCACCTG
ACCCCATGCCGAATCAGAAGTGAAACGCCGTAGCGCCGATGGTAGTGTGG
GGTCTCCCCATGCG
```

Al comparar la secuencia obtenida del plásmido candidato con la que se tiene reportada en la literatura, se comprobó que esta coincidía completamente. A este nuevo plásmido se le llamó PC3C.

Una vez obtenido el plásmido PC3C, el siguiente paso consistió en realizar la inducción de la proteína. Se ensayaron varias condiciones encontrando que las óptimas fueron cuando las bacterias se crecieron a una densidad óptica de 0.8 (a $\lambda=600$ nm) y a una concentración de IPTG de 1mM durante 4 horas en agitación constante a 37°C. Una vez obtenida la proteasa se procedió a su purificación con perlas de Ni-NTA; sin embargo la proteína no se unía. Para plantear la razón de este hecho se hizo un análisis del vector de expresión, encontrando que éste contenía un sitio de corte conformado por los aminoácidos glutamina (gln o Q) y glicina (gly o G), el cual es idéntico a uno de los

sitios de corte que reconoce esta proteasa y que separa la cola de histidinas de la proteína expresada, razón por la cual no se unió a las perlas de Ni-NTA.

Dado lo anterior se planteó un nuevo método de purificación de esta proteína, que consistió en realizar una precipitación con sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 40% (Figura No. 17).

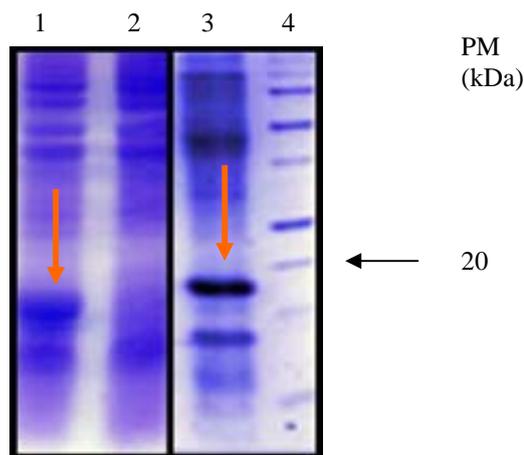


Figura No. 17. Inducción y purificación de la proteasa 3C del virus Norwalk con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 40% . Las células DH5 α fueron tratadas sin (carril 2) y con (carril 1) IPTG a una concentración final de 1 mM; la proteína parcialmente purificada (carril 3) se observa por debajo del marcador de 20 kDa (carril 4), la 3C está indicada con flechas naranjas; las muestras se sometieron a electroforesis en un gel de acrilamida-bisacrilamida al 15%.

Una vez que ya se tenía la proteasa 3C purificada parcialmente el siguiente paso fue determinar su actividad proteolítica. Para ello, se escogió como sustrato la proteína recombinante La (rLa), la cual fue expresada en el laboratorio. El peso molecular de la proteína La nativa es de 52 kDa, sin embargo, la rLa se encuentra fusionada a la enzima glutatión-S- transferasa (GST), por lo que su peso es de aproximadamente 75 kDa.

Para determinar si la proteasa 3C era capaz de procesar a la proteína rLa, ambas proteínas se incubaron y la integridad de la proteína La se determinó mediante un ensayo de Western blot con anticuerpos α -La comerciales (Fig. No. 18).

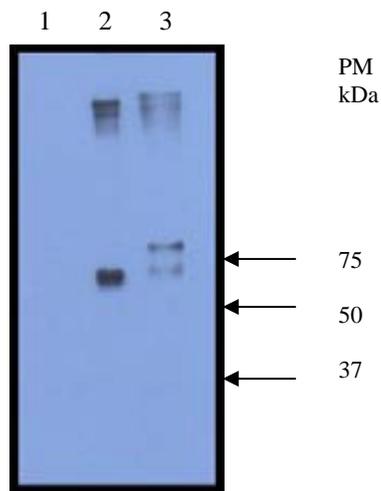


Figura No. 18: Ensayo de Western blot de la proteína rLa procesada con r3C. La proteína rLa fue incubada en ausencia (carril 3) o en presencia (carril 2) de la proteasa r3C, sometida a electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS, transferida a membranas de nitrocelulosa e incubada con el α -La. Carril 1: proteasa r3C. Los marcadores de peso molecular se indican a la derecha de la figura.

En este ensayo se observa que, la proteína rLa sola, tiene un peso molecular de 77 kDa, como se esperaba (Fig. No. 18 carril 3), mientras que, esta misma proteína incubada con la r3C, presentó un peso molecular de aproximadamente 60kDa, lo que sugiere que la rLa está siendo procesada por la proteasa r3C.

Sin embargo, para determinar que el procesamiento ocurría sobre la rLa y no sobre la proteína GST se realizó un ensayo de corte bajo las mismas condiciones, pero con GST como sustrato (Fig. No. 19).

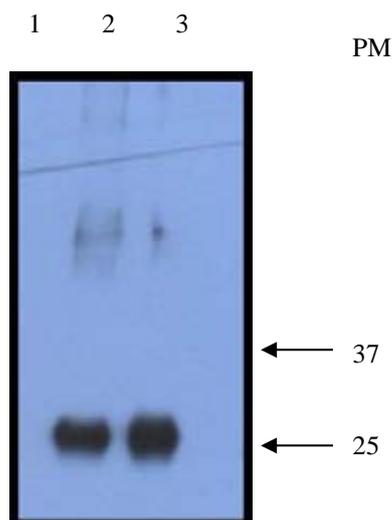


Figura No. 19. Ensayo de corte sobre la proteína rGST. La proteína GST recombinante fue incubada en ausencia (carril 2) o en presencia (carril 3) de la proteasa r3C y sometida a electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS, transferida a membranas de nitrocelulosa e incubada con anticuerpo α -GST. Carril 1: proteasa r3C. Los marcadores de peso molecular se indican a la derecha de la figura

Como podemos observar la proteína rGST no es procesada por la r3C. Sin embargo, también existía la posibilidad de que la secuencia GST estuviera procesándose (removiéndose) de la proteína rLa.

Para determinar si la proteína rLa estaba perdiendo a la secuencia de la GST, se calculó exactamente el peso molecular de la proteína que sufrió un procesamiento por la proteína r3C, se realizó una gráfica y se extrapolo el valor experimental (medido en cm) de esta proteína. Debido a que se trabajaron con dos marcadores de peso molecular diferentes, a continuación se muestra la Tabla No. 1 (marcadores BenchMark™ Pre-stained Ladder y su correspondiente gráfica (Figura No. 20). Posterior a ésta se encuentra la Tabla No. 2 (marcadores BIORAD™) y su gráfica (Figura No. 21).

| Peso molecular (PM) kDa | Distancia cm |
|----------------------------|-----------------|
| 37 | 1 |
| 49 | 2 |
| 64 | 2.25 |
| 82 | 3.55 |
| 115 | 4.35 |
| 180 | 5.1 |

Tabla No. 1. Relación de las distancias y los PM con marcadores BenchMark™ Pre-stained Ladder. Las distancias se midieron directamente sobre la placa del Western blot y éstas representan el promedio de 3 ensayos.

Una vez obtenidas las mediciones se procedió a graficar dichos valores, dando como resultado un gráfico de tipo exponencial, del cual se obtuvo la ecuación correspondiente.

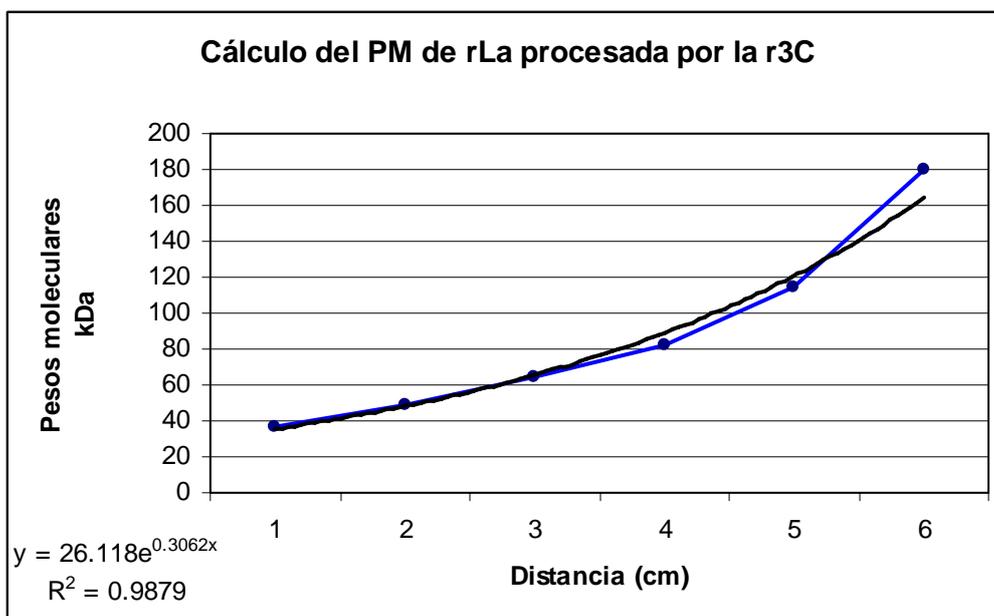


Figura No. 20. Gráfica que representa la tendencia de los valores obtenidos de las distancias entre los marcadores de PM BenchMark™ Pre-stained Ladder. La tendencia de los datos indica que se trata de un gráfico de tipo exponencial, la ecuación del gráfico y el valor de R^2 se muestran en éste. Los datos experimentales se indican en línea azul y la línea de tendencia en negra.

| Peso molecular (PM) kDa | Distancia cm |
|----------------------------|-----------------|
| 37 | 1 |
| 50 | 2.03 |
| 75 | 3.13 |
| 100 | 3.7 |
| 150 | 4.33 |
| 250 | 4.76 |

Tabla No. 2. Relación de las distancias y los PM con marcadores BIORAD™. Las distancias se midieron directamente sobre la placa del Western blot y éstas representan el promedio de 3 ensayos.

Al igual que lo anterior, se graficaron estos valores y se obtuvo la segunda ecuación de la gráfica.

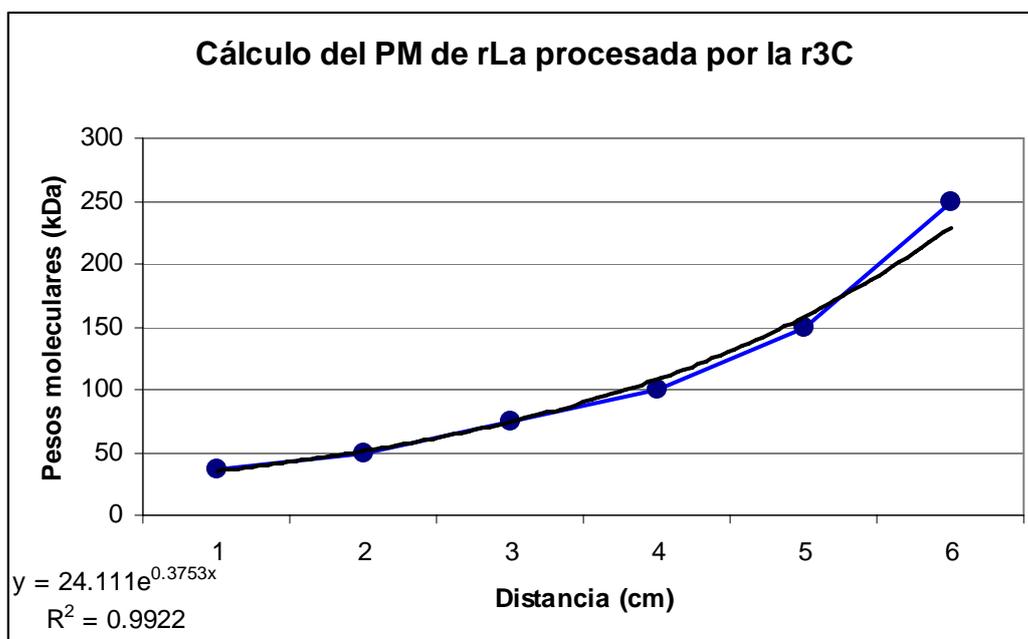


Figura No. 21. Gráfica que representa la tendencia de los valores obtenidos de las distancias entre los marcadores de PM BIORAD™. La tendencia de los datos indica que se trata de un gráfico de tipo exponencial, la ecuación del gráfico y el valor de R^2 se muestran en éste. Los datos experimentales se muestran en la línea azul y la línea de tendencia está en negra.

De las dos ecuaciones de las gráficas obtenidas se calculó el peso de la proteína rLa procesada haciendo la sustitución correspondiente (Tabla No. 3).

| Marcador | Distancia en cm de rLa procesada por la r3C | Ecuación del gráfico | Peso molecular obtenido (kDa) |
|-------------------------------|---|---------------------------|-------------------------------|
| BenchMark™ Pre-stained Ladder | 2.7 | $y=26.118e^{0.3062x}$ | 59.70 |
| BIORAD™ | 2.3 | $y=24.111e^{0.3753x}$ | 57.16 |
| | | Promedio de los PM | 58.43 |

Tabla No. 3: Peso molecular calculado de la proteína rLa procesada por la proteasa r3C del virus Norwalk. En la placa del Western blot del ensayo de procesamiento de la rLa se midieron las distancias de 2.7 y 2.3 cm (por ser la altura donde se observó la proteína rLa procesada por la r3C) y son los valores que se extrapolan en las ecuaciones de las gráficas (Figura No. 20 y 21).

7.- DISCUSIÓN

El NV es el prototipo de los *Norovirus*, éstos son agentes etiológicos importantes de gastroenteritis aguda tanto en los países desarrollados como en los países en vías de desarrollo y hoy en día son reconocidos como los agentes causales más importantes de brotes de gastroenteritis no bacteriana (2,4). Aunque los *Norovirus* fueron originalmente identificados hace más de 30 años, nuestro entendimiento de su ciclo de replicación y mecanismos de patogenicidad ha sido limitado debido a que estos virus no son cultivables convenientemente en las líneas celulares establecidas y a que no está disponible un modelo animal para estudiar la infección viral (16).

Los virus contienen genomas muy austeros, por lo que no pueden codificar los elementos necesarios para su replicación, esta condición los hace parásitos intracelulares obligados, dado que deben tomar control de la maquinaria celular para llevar a cabo su replicación. Es por esto, que para poder detener la infección de un virus en su célula blanco es necesario conocer como lleva a cabo estos procesos y su dependencia por moléculas claves para su replicación. Este conocimiento es muy importante en el desarrollo de vacunas o tratamientos farmacológicos para su control, ya que todos los puntos de regulación del ciclo viral podrían funcionar como blancos terapéuticos.

Desafortunadamente, el ciclo de replicación de NV no se conoce completamente; a pesar de esto la clonación y secuenciación exitosa del genoma del virus ha permitido grandes avances en el conocimiento sobre la biología de este virus; como la organización genómica, la replicación del RNA viral y la expresión genética (3). Así mismo, los virus codifican proteasas que son indispensables en el establecimiento de la infección, ya que son herramientas que modifican a las proteínas del hospedero, tanto para inhibir su función celular como para lograr que participen en las virales.

Tomando como base lo anterior, en este trabajo se realizó la clonación de la proteasa 3C de NV, ya que siendo la única proteína con actividad proteolítica con que cuenta este virus, es muy posible que ésta juegue un papel fundamental en su ciclo de replicación y traducción.

Para lograr la clonación exitosa de la proteína r3C, se diseñaron los oligonucleótidos mediante un análisis *in silico* de la secuencia de este gen. De esta manera se obtuvo por PCR el gen de la proteasa viral 3C, que fue insertado en un vector de clonación. Esto nos permitió escindirlo por restricción enzimática, dando la ventaja de poder cortarlo con la enzima XhoI; lo cual es más eficiente cuando la secuencia de interés está clonada, en comparación con el producto de PCR, en donde el sitio de restricción se localiza en los extremos y por ello la enzima es menos eficiente. Una vez purificado el gen, este fue clonado en un vector de expresión procarionte: pPRO EXTM HTb, lo cual era necesario para realizar la inducción de la producción de la proteína 3C en el marco de lectura adecuado. Para expresar a la proteína r3C, fue necesario probar distintas condiciones de temperatura, tiempo de inducción y concentración de IPTG, el cual se utiliza como un imitador molecular de la alolactosa, un metabolito de la lactosa que pone en funcionamiento la transcripción del operon lac. El IPTG induce la actividad de la beta-galactosidasa, una enzima que promueve la utilización de lactosa por unión e inhibiendo al represor lac; es una molécula artificial que si bien puede interaccionar con el represor no puede ser metabolizada.

De esta manera se establecieron las condiciones óptimas para la inducción de la proteasa r3C: D.O. a $\lambda=600$ nm de 0.8 a 1, IPTG a una concentración final de 1 mM durante 4 horas a 37 °C en agitación constante.

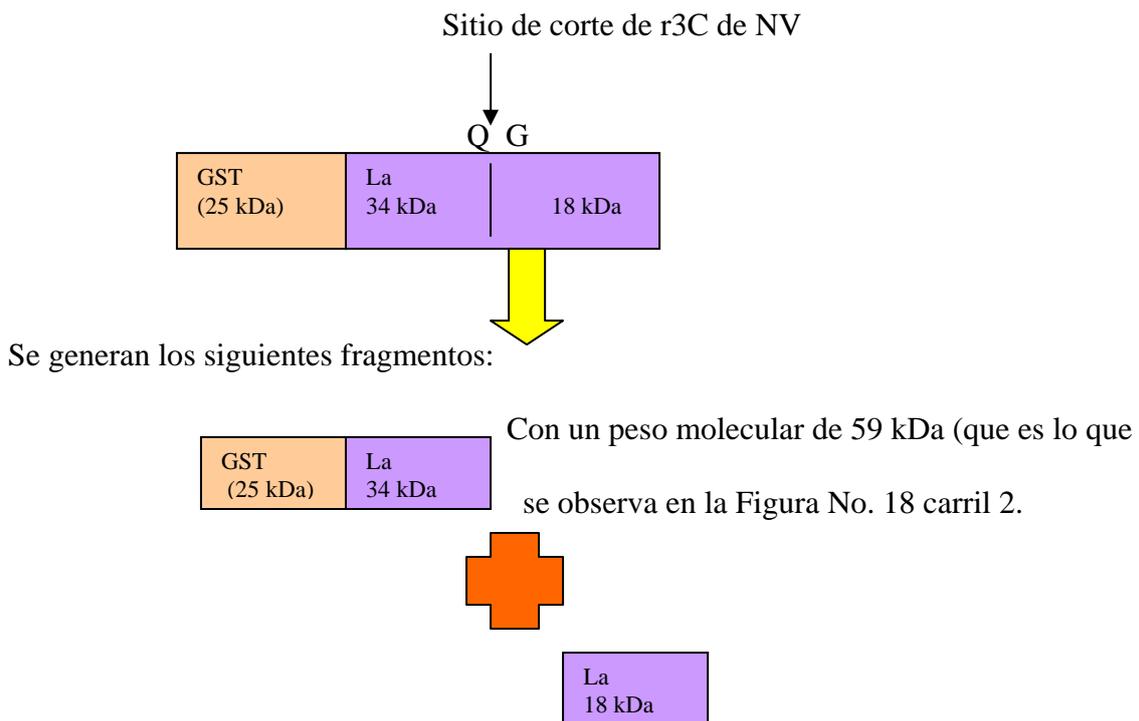
Una vez que logramos inducir a la proteína r3C, era necesario purificarla con la finalidad de poder determinar su actividad proteolítica. Dado que la r3C se expresó en

un vector que permite la adición de una cola de histidinas, su purificación resultaba muy adecuada mediante perlas de afinidad a Ni-NTA. A pesar de haber trabajado con varias condiciones para poder purificar a la proteína con este método, no se logró, lo cual obligó a determinar las causas que provocaron esto. Una posibilidad es que, por alguna razón, la r3C hubiera perdido la cola de histidinas, por lo cual se realizaron ensayos de detección mediante Western blot con anticuerpos α -histidinas. Los anticuerpos antihistidinas no detectaron a la proteína r3C; sin embargo si reaccionaron con otra proteína recombinante con histidinas (datos no mostrados). Estos resultados podían deberse a que la proteína r3C había perdido las histidinas o a que estas no estaban accesibles para su detección. Sin embargo, dado que la electroforesis de esta proteína se realizó bajo condiciones desnaturizantes, era más probable que no presentara las histidinas. Mediante un ensayo *in silico* se determinó que, en la secuencia del vector hay un sitio de aminoácidos Q-G, localizado entre la secuencia de histidinas y la del gen de la 3C, que es uno de los sitios de corte de la proteasa 3C de NV. Este sitio de corte está siendo reconocido por la proteasa 3C y con ello, se está eliminando la cola de histidinas de la r3C. Es por ello, que se utilizó como metodología para su purificación la precipitación con sulfato de amonio, lo cual además permitió su obtención sin desnaturalizarla, por lo que su actividad proteolítica se conservó.

Para probar que realmente la proteasa r3C de NV tenía actividad proteolítica, se utilizó como sustrato a la proteína rLa; ya que se conoce que la proteasa 3C del virus de la polio (sumamente parecida a la de NV) y que corta en sitios semejantes a la 3C de NV, procesa a la proteína La tanto recombinante como a la forma nativa en células HeLa. El sitio de corte de la proteína La por la proteasa de PV se localiza en el extremo carboxilo terminal, específicamente en los aminoácidos 358 y 359 que corresponden a Glutamina (Gln o Q) y Glicina (Gly o G), lo que produce 2 fragmentos, uno de 48 y

otro de 4 kDa, ya que su peso molecular es de 52 kDa.

Para determinar si la proteasa r3C de NV era capaz de procesar a la proteína rLa (obtenida en el laboratorio por el M. en C. Carlos Sandoval Jaime) se interaccionaron ambas proteínas recombinantes. La proteína rLa, se encuentra fusionada a GST (25 kDa), que, al igual que las histidinas, es utilizada para la purificación de proteínas recombinantes, por lo que su peso molecular es de 77 kDa. Una vez que se interaccionaron ambas proteínas, se logró observar que, efectivamente la proteína presentó un peso molecular de 60 kDa, el cual es menor al de la proteína La que no fue interaccionada con la r3C. Mediante un ensayo *in silico*, se determinó que en la proteína La existe al menos 1 sitio que la proteasa r3C de NV podría reconocer, y que produciría péptidos de 59 y 18 kDa, como se muestra a continuación:



El tamaño del péptido que nosotros detectamos es de 59 kDa. Lo cual sugiere que la proteína La fue procesada en el sitio QG localizado en los nucleótidos 358 y 359,

lo que nos permite especular que el péptido de 58 kDa contiene a la GST completa y a una región del extremo amino terminal de la proteína La de 34 kDa, lo cual coincide con los sitios probables de corte.

Otra posibilidad es que el péptido de 58 kDa estuviera formado por la proteína La completa y un segmento de la GST que estuviera siendo procesado por la proteasa r3C, sin embargo los ensayos de corte de la proteína GST con la proteasa r3C (Figura No. 19) demuestran que esta no corta a la GST. Por último, es conocido que algunas proteínas de fusión pueden separarse de la GST; sin embargo si este fuera el caso, el péptido reconocido por los anticuerpos α -La tendría que ser de 52 kDa, lo cual no concuerda con el tamaño de 58 kDa. Todos estos resultados nos permiten determinar que la proteasa r3Cde NV es capaz de procesar a la rLa *in vitro*.

El hecho de que la proteasa r3C de NV sea capaz de procesar a la proteína rLa, es un hallazgo importante que nos sugiere que esta proteína podría estar participando en la replicación de NV, como ocurren el caso de PV, en donde se ha documentado que la proteasa 3C de PV procesa a la proteína La y, con ello se provoca que esta pierda su señal de localización nuclear que se encuentra en el carbonilo terminal, lo cual trae como consecuencia su relocalización hacia el citoplasma y con ello se favorece su participación en el inicio de la traducción de este virus.

Dada la importancia de La en la traducción y con los antecedentes que se tienen del virus de la polio se podría pensar que el procesamiento *in vitro* de la rLa por la proteasa r3C de NV, podría también estar ocurriendo en la célula como consecuencia de la infección por NV, como una estrategia del virus para favorecer su replicación.

8.- CONCLUSIONES

- ❖ Se clonó el gen de la proteasa 3C del virus Norwalk en el vector de expresión procarionte pPROEX™ HTb. A este plásmido se le llamó PC3C.
- ❖ Las condiciones para una óptima expresión de la proteasa recombinante 3C de NV son: D.O. de 0.8 a $\lambda=600$ nm, IPTG 1mM por 4 horas a 37°C.
- ❖ Se realizó la purificación parcial de la proteasa recombinante 3C del virus Norwalk con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 40%.
- ❖ La proteasa recombinante 3C del virus Norwalk posee una actividad proteolítica *in vitro*.
- ❖ La proteasa recombinante 3C de NV ejerce un procesamiento proteolítico *in vitro* sobre la proteína recombinante La

9.- ANEXO

1.- Soluciones utilizadas para la elaboración de bacterias competentes por el método de cloruro de rubidio.

Buffer TfbI

Acetato de potasio 30 mM
Cloruro de rubidio 100 mM
Cloruro de calcio 10 mM
Cloruro de manganeso 50 mM
Glicerol 15% (v/v)
Ajustar a pH 5.8 con ácido acético

Buffer TfbII

MOPS (ácido 3-N-morfolinopropanosulfónico) 10 mM
Cloruro de calcio 75 mM
Cloruro de rubidio 10 mM
Glicerol 15% (v/v)
Ajustar a pH 6.5 con NaOH

2.- Solución utilizada para la preparación de geles de agarosa.

TBE 10X

Trizma base 108 g
Ácido bórico 55 g
EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 9.3 g
Aforar a 1000 ml con agua destilada, ajustar pH a 8.3 y esterilizar

3.- Soluciones utilizadas para la extracción de plásmido por técnica de lisis alcalina.

Solución I

50 mM de glucosa
25 mM de Tris-HCl (pH 8)
10 mM EDTA (pH 8)

Solución II

Preparar al momento de utilizar
0.2 N de NaOH
1% (w/v) de SDS (dodecilsulfato sódico)

Solución III

5 M de acetato de potasio
11.5 mL de ácido acético glacial
28.5 mL de agua destilada

4.- Soluciones utilizadas para la purificación de plásmidos.

Buffer P1

Tris-HCl 50 mM con pH 8.0
EDTA 10 mM
RNAsa A 100 µg/mL

Buffer P2 (buffer de lisis)

NaOH 200 mM
SDS 1% (w/v)

Buffer P3

Acetate de potasio 3.0 M, pH 5.5

Buffer QBT

NaCl 750 mM
MOPS 50 mM, pH 7.0
Isopropanol 15% (v/v)
Triton^RX-100 0.15% (v/v)

Buffer QC

NaCl 1.0 M
MOPS 50 mM. pH 7.0
Isopropanol 15% (v/v)

Buffer QF (buffer de elusion)

NaCl 1.25 M
Tris.HCl 50 mM, pH 8.5
Isopropanol 15% (v/v)

Buffer TE

Tris-HCl 10 mM, pH 8.0
EDTA 1 mM

5.- Soluciones utilizadas para la expresión y purificación de la proteína recombinante 3C.

Medio de cultivo Luria

20 g/1000 mL de agua destilada, compuesto por peptona de caseína 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, cloruro de sodio 5 g/L

IPTG (isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido) 1M

238 mg/mL en agua destilada

Buffer de lisis

Fosfato de sodio dihidratado 50 mM
Cloruro de sodio 300 mM
Imidazol 10 mM
Tritón X-100 (t-octilfenoxipolietoxietanol) 5mL

Lisozima

10 mg de lisozima en 1 mL de agua destilada.

6.- Soluciones para la preparación de geles desnaturalizantes para proteínas de acrilamida-bisacrilamida**Solución A**

Acrilamida 30 g

Bis acrilamida 0.8 g

Aforar a 100 mL con agua destilada.

Solución B

Tris base 12.11g

Ajustar pH a 8.8 con HCl, aforar a 100 mL con agua destilada.

Solución C

SDS 10 g

Aforar a 100 mL con agua destilada

Solución D

Trizma base 12.11 g

Ajustar pH a 6.8 con agua destilada

Persulfato de amonio al 10%: 1g y aforar a 10 mL con agua destilada

Solución de Coomassie

Azul de Coomassie R250 0.2%

Metanol 50%

Ácido acético 7%

Solución de desteñido

Metanol 30%

Ácido acético 7%

7.- Solución para los ensayos de corte de la r3C**Buffer de corte para la proteasa 3C de NV**

NaCl 100 mM

MgCl₂ 5mM

HEPES-KOH 10 mM

pH 7.4

8.- Soluciones para el Western blot

PBS 10X

Fosfato de sodio dihidratado 2.4 g

Fosfato de sodio dibásico 7-hidrato 14.4 g

Cloruro de sodio 80 g

Cloruro de potasio 2 g

Aforar a 1000 mL con agua destilada, ajustar pH a 7.2-7.4 con NaOH 1M o HCl 1M

PBST 0.5%

Diluir del PBS 10x lo necesario para una solución 1X

Tween 0.5% (v/v)

Rojo de ponceau

Rojo de Ponceau 0.2 g

Ácido acético glacial 1mL

Aforar a 100 mL.

10.- REFERENCIAS

- 1.- **Boga, J., Melón, S., Nicieza, I., de Diego, I., Villar, M., Parra, F. y de Oña, M.** 2004. Etiology of sporadic cases of pediatric acute gastroenteritis in Asturias, Spain and genotyping and characterization of Norovirus strains involved. *J. Clin. Microbiol.* 42:2668-2674.
- 2.- **Buesa, J., Collado, B., López-Andújar, P., Abu-Mallouh, R., Rodríguez, J., García, A., Prat, J., Guix, S., Llovet, T., Prats, GF. And Bosch, A.** 2002. Molecular epidemiology of caliciviruses causing outbreaks and sporadic cases of acute gastroenteritis in Spain. *J. Clin. Microbiol.* 40: 2854-2859.
- 3.- **Parshionikar, S., Willian-True, S., Shay, G., Robbins, D., Seys, S., Cassady, J. and Harris, R.** 2003. Waterborne outbreak of gastroenteritis associated with a Norovirus. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 5263-5268.
- 4.- **Atmar, R. and Estes, M.** 2001. Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 14: 15-37.
- 5.- **Clarke, I. and Lambden, P.** 2000. Organization and expression of calicivirus genes. *J Infect Dis.* 181: S309-16.
- 6.- **Hardy, M.** 2005. Norovirus protein structure and function. *FEMS Microbiology Letters.* 253: 1-8.
- 7.- **Blakeney, S., Cahill, A. and Reilly, P.** 2003. Processing of Norwalk virus nonstructural proteins by a 3C-like cysteine protease. *Virology.* 308: 216-224.
- 8.- **Estes, M., Ball, J., Guerrero, R., Opekun, A., Gilger, M., Pacheco, S. and Gram., D.** 2000. Norwalk virus vaccines: challenges and progress. *J. Infect Dis.* 181: S367-73
- 9.- **Belliot, G., Sosnovtsev, S., Chang, K., Babu, V., Uche, U., Arnold, J., Cameron, C. and Green, K.** 2005. Norovirus proteinase-polymerase and polymerase are both active forms of RNA-dependent RNA polymerase. *J. Virol.* 79: 2393- 2403.
- 10.- **Zheng, D., Ando, T., Fankhauser, R., Beard, R., Glass, R. and Monroe, S.** 2005. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology.* 346: 312-323.
- 11.- **Shin, G. and Sobsey, M.** 2003. Reduction of Norwalk virus, Poliovirus 1, and Bacteriophage MS2 by ozone disinfection of water. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 3975-3978.
- 12.- **Wolin, S. and Cedervall, T.** 2002. The La protein. *Annu. Rev. Biochem.* 71:375-403.
- 13.- **Frederiks, W. and Mook, O.** 2004. Metabolic mapping of proteinase activity with emphasis on in situ zymography of gelatinases: review and protocols. *J. Histochem. Cytochem.* 52:711-722.

- 14.- Dougherty, W. and Semler, B.** 1993. Expression of virus-encoded proteinases: functional and structural similarities with cellular enzymes. *Microbiol. Rev.* 57:781-822.
- 15.- Patick, A. and Potts, K.** 1998. Protease inhibitors as antiviral agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 11:614-627.
- 16.- Guix, S., Asanaka, M., Katayama, K., Crawford, S., Neill, F., Atmar, R. and Estes, M.** 2007. Norwalk virus RNA is infectious in mammalian cells. *J. Virol.* 81: 12240-12248.
- 17.-Knipe, D. and Howley, P.** 2001. *Fields Virology*. Volume 1. Fourth edition. Editorial Lippincott Williams & Wilkins. United States of America. Páginas 841-850.
- 18.- Ausina, V. y Guillén, S.** 2005. *Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. Editorial Médica Panamericana, España. Páginas: 1363-1365.
- 19.- Cabello, R. y Benavente, H.** 2002. *Síndrome diarreico infeccioso*. Editorial Médica Panamericana, México, D.F. Páginas: 77, 80-84.
- 20.- Wobus, C., Thackray, L., Virgin, H.** 2006. Murine Norovirus: a model system to study Norovirus biology and pathogenesis. *J. Virol.* 80:5104-5112.
- 21.- Más, P. and Beachy, R.** 1999. Replication of Tobacco Mosaic Virus on endoplasmic reticulum and role of the cytoskeleton and virus movement protein in intracellular distribution of viral RNA. *J. Cell Biol.* 147:945-958.
- 22.- Lai, M.** 1998. Cellular factors in the transcription and replication of viral RNA genomes: a parallel to DNA-dependent RNA transcription. *Virology.* 244: 1-12.
- 23.- Ahlquist, P., Noueiry, A., Lee, W., Kushner, D. and Dye, B.** 2003. Host factors in positive-strand RNA virus genome replication. *J. Virol.* 77: 8181-818.
- 24.- Wagner, E. and Hewlett, M.** 1999. *Basic Virology*. Edited by Blackwell Science, United States of America. Pages: 250-253.
- 25.- Lloyd, R.** 2006. Translational control by viral proteinases. *Virus Research.* 119: 76-88.
- 26.- Tamura, M., Natori, K., Kobayashi, M., Miyamura, T. and Takeda, N.** 2000. Interaction of recombinant Norwalk virus particles with the 105-kilodalton cellular binding protein, a candidate receptor molecule for virus attachment. *J. Virol.* 74: 11589-11597.
- 27.- Shiroki, K., Isoyama, T., Kuge, S., Ishii, T., Ohmi, S., Hata, S., Suzuki, K., Takasaki, Y. and Nomoto, A.** 1999. Intracellular redistribution of truncated La protein produced by poliovirus 3C^{pro}-mediated cleavage. *J. Virol.* 73: 2193-2200.

- 28.- Gutiérrez-Escolano ana Lorena, Vázquez-Ochoa, M., Escobar-Herrera J. and Hernández-Acosta, J.** 2003. La, PTB and PABP bind to the 3' untranslated region of Norwalk virus genomic RNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 311: 759-766.
- 29.- Kuyumcu-Martinez, M., Belliot, G., Sosnovtsev, S., Chabg, K., Green, K. and Lloyd R.** 2004. Calicivirus 3C-like proteinase inhibits cellular translation by cleavage of Poly(A)-Binding Protein. *J. Virol.* 78: 8172-8182.
- 30.- Ulrike, S., Rudolph, W., Gebhardt, J. and Rohayem, J.** 2007. Differential cleavage of the Norovirus polyprotein precursor by two active forms of the viral protease. *J. Gen. Virol.* 88: 2013-2018.
- 31.- Hardy, M., Crone, T., Brower, J. and Ettayebi, K.** 2002. Substrate specificity of the Norwalk virus 3C-like proteinasa. *Virus Res.* 89: 29-39.
- 32.- Mattioli, M., Svitkin, Y. and Sonenberg, N.** 2004. La autoantigen is necessary for optimal function of the Poliovirus and Hepatitis C virus internal ribosome entry site in vivo and in vitro. *Mol. Cell. Biol.* 24: 6861-6870-